PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

J. BRACHET
BRUXELLES

N. KAMIYA
OSAKA

A. PISCHINGER
WIEN

S. STRUGGER
MÜNSTER

HERAUSGEGEBEN VON

JOSEF SPEK
ROSTOCK

FRIEDL WEBER
GRAZ

KARL HÖFLER
WIEN

BAND LI, HEFT 2
MIT 113 TEXTABBILDUNGEN
ABGESCHLOSSEN AM 15. MAI 1959

WIEN
SPRINGER-VERLAG
1959

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint zwanglos in einzeln berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 650 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung. Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

Prof. Dr. Fr. Weber, Pflanzenphysiologisches Institut, Graz, Schubertstraße 51, Österreich, oder

Prof. Dr. J. Spek, Zoologisches Institut, (3a) Rostock, Universitätsplatz, DDR, oder

Prof. Dr. K. Höfler, Pflanzenphysiologisches Institut, Wien I, Dr.-Karl-Lueger-Ring 1, Österreich oder

zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag in Wien I, Mölkerbastei 5

Fernsprecher: 63 96 14 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien.

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen, die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschreiten die Autorkorrekturen 10 % der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfertig abgeliefert werden. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Farbige Abbildungen können nur auf Kosten des Autors angefertigt werden. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist im Interesse der Bezieher der Zeitschrift ein Kostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen im allgemeinen den Umfang von 1½ Druckbogen (24 Seiten) nicht überschreiten.

„Vorläufige Mitteilungen" und Auseinandersetzungen polemischen Inhalts werden nicht angenommen. Grundsätzlich werden nur Arbeiten aufgenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen. Die Autoren erhalten 100 Separata ihrer Arbeit kostenlos und können maximal weitere 100 Separata zum angemessenen Preis beziehen. Die Bestellung muß mit dem dem Fahnenabzug beigelegten Bestellzettel bei der Rücksendung der korrigierten Fahnen erfolgen.

Unkostenersatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

Der Verlag

LI. Band — Inhaltsverzeichnis — 2. Heft

Abhandlungen

Seite

Wehrmeyer, W.: Entwicklungsgeschichte, Morphologie und Struktur von Tabakmosaikvirus-Einschlußkörpern unter besonderer Berücksichtigung der fibrillären Formen 165

Richter, I.-E.: Bewegungsphysiologische Untersuchungen an polycystiden Gregarinen unter Anwendung des Mikrozeitrafferfilmes 197

Wehrmeyer, W.: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Cytologie tabakmosaikvirus-infizierter Tabakpflanzen 242

Diannelidis, T., und K. Mitrakos: Vergleichende Untersuchungen über das Plasmalemma von Meeresalgen 265

Heber, U.: Beziehungen zwischen der Größe von Chloroplasten und ihrem Gehalt an löslichen Eiweißen und Zuckern im Zusammenhang mit dem Frostresistenzproblem 284

Sterling, C.: Lipoidal Crystals in Onion 299

Pfeiffer, H. H.: Protoplasmatische und biorheologische Untersuchungen an pflanzlichen Milchsäften 307

Meyer, J.: Le caractère précocement idioblastique des initiales stomatiques du pétiole de *Populus pyramidalis* Rozier 313

Entwicklungsgeschichte, Morphologie und Struktur von Tabakmosaikvirus-Einschlußkörpern unter besonderer Berücksichtigung der fibrillären Formen[1]

Von

W. Wehrmeyer

Aus dem Botanischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster in Westfalen

Mit 21 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. August 1958)

Seit Beginn der cytologischen Erforschung virusinfizierter Pflanzenzellen (Iwanowski 1903) haben die im Zuge der Virusinfektion entstehenden Einschlußkörper die Aufmerksamkeit der Untersucher auf sich gezogen. Die Einschlußkörper stellen die auffälligste und eindrucksvollste Abweichung der virusinfizierten Zelle von der gesunden dar; viele von ihnen treten regelmäßig und in großer Menge auf; sie sind die ersten lichtmikroskopisch erfaßbaren Anzeichen einer Zellveränderung nach einer Virusinfektion. Durch neuere elektronenmikroskopische Untersuchungen (Brandes 1955 und 1956; Amelunxen 1956) ist der Aufbau einiger Einschlußkörper aus Virusmaterial bewiesen worden, so daß man von Viruseinschlußkörpern im exakten Sinne sprechen kann. Damit hat sich die Bedeutung der Einschlußkörper für die cytologische Erforschung virusinfizierter Zellen noch gesteigert. Die Viruseinschlußkörper stellen den einzigen lichtmikroskopisch möglichen Direktnachweis des Virus in der Zelle dar und das erste wirklich eindeutige, sehr frühzeitig auftretende Anzeichen einer gelungenen Virusinfektion. Das aber sind die notwendigen Voraussetzungen aller weiteren cytologischen Untersuchungen an virusinfizierten Zellen. Bei fehlender oder noch nicht erfolgter äußerer Symptombildung ist die so schwierige Lokalisation der virusinfizierten Zelle nur auf Grund der Viruseinschlußkörper sicher durchzuführen.

[1] Die vorliegende Veröffentlichung stellt den gekürzten ersten Teil einer Dissertation (Münster 1958) dar, die unter Anleitung von Herrn Professor Dr. S. Strugger im Botanischen Institut der Universität Münster entstand.

Material und Methode

Es wurde mit drei Stämmen des Tabakmosaikvirus (TMV) gearbeitet, einem normalen Grünstamm TMV-Vulgare und zwei Gelbstämmen TMV G 2 und TMV G 7[2]. Eine Unterscheidung der beiden Gelbstämme auf Grund ihrer äußerlich sichtbaren Symptomausprägung erfolgt nach Köhler (1942) auf *Solanum nodiflorum* Jacq. als Wirtspflanze; auf *Nicotiana tabacum* L. var. Samsun (Samsuntabak) war sie nur ungenau möglich. Cytologisch sind beide Stämme aber auf Grund ihrer Einschlußkörper auch auf Samsuntabak deutlich zu unterscheiden. Der Gelbstamm G 2 wird durch die ausschließlich bei ihm vorkommenden Schleifen charakterisiert. Als Wirtspflanzen standen die Rassen *Nicotiana tabacum* L. var. Samsun (Samsuntabak) und var. White Burley (White Burley-Tabak) zur Verfügung[2].

1. Methode der Blütenuntersuchung virusinfizierter Pflanzen:

Die Übertragung des Virus auf die gesunden Tabakpflanzen erfolgte durch Inokulation jeweils eines gleichwertigen Blattes der etwa 10—20 cm hohen Pflanzen mit dem unverdünnten Pflanzenpreßsaft virusinfizierter Tabakblätter der drei TMV-Stämme unter Verwendung von Karborundpulver mit Hilfe eines Glasspatels. Eine erste methodische Einführung erhielt der Verfasser während seines Aufenthaltes in der Biologischen Bundesanstalt, Institut für landwirtschaftliche Virusforschung in Braunschweig, Juli 1953. Die Kontrollen wurden in methodisch gleicher Weise mit dem Pflanzenpreßsaft gesunder Tabakpflanzen inokuliert. Auf eine möglichst gleichartige Ausführung der Inokulation im Hinblick auf Preßsaftgewinnung und Virusübertragung wurde besonders geachtet.

Nach unterschiedlich starker Wachstumshemmung kommt es bei allen systemisch erkrankten Pflanzen zur Blütenbildung. Das Auffinden der virushaltigen Gewebe im oberen, normalerweise rotgefärbten Corollenteil wird durch den Anthocyanausfall in diesen Bezirken erleichtert. Die virushaltigen Gewebe erscheinen weiß oder blaßrosa, sofern das Virus in den Epidermiszellen vorliegt; ein starkes Virusvorkommen im Mesophyll ohne Anthocyanausfälle in der darüberliegenden, virusfreien Epidermis ist möglich. Im farblosen Tubusbereich der Blüte sind die virushaltigen Gewebe vor jeder cytologischen Untersuchung erst durch lichtmikroskopische Kontrolle der Einschlußkörper festzustellen.

Ausschlaggebend für die Wahl der Blüten zur cytologischen Untersuchung virusinfizierter Zellen war die hier gegebene Möglichkeit zur Vitalanalyse ohne Anwendung störender Dünnschnittechnik. Untersucht wurden die nach totaler Wasserinfiltration durchsichtigen Blütenteile. Die zur Untersuchung unumgängliche Infiltration der Gewebe (Strugger 1949) erwies sich als ein schonender Eingriff, der die Vitalität der Zellen über längere Zeit nicht beeinträchtigt. Die Beobachtung der virushaltigen Blüten-

[2] Für die Überlassung der TMV-Stämme und des Tabaksaatgutes sei den Herren Oberreg.-Rat Dr. E. Köhler und Reg.-Rat Dr. O. Bode von der Biologischen Bundesanstalt, Institut für landw. Virusforschung, Braunschweig, an dieser Stelle herzlich gedankt.

teile erfolgte vorzugsweise von der papillenfreien, außenseitigen Epidermis her; im Tubusbereich sind beide Epidermen frei von Papillen, so daß hier störungsfreie Beobachtung von beiden Seiten möglich ist.

2. Untersuchung keimlingsinfizierter Pflanzen:

Das Wachstum des Tabaks wird je nach Zeitpunkt und Stärke der Virusinfektion und je nach Virusstamm und Jahreszeit unterschiedlich stark gehemmt, so daß der Blühtermin virusinfizierter Pflanzen unberechenbar ist. Um deshalb vom Blütenmaterial unabhängig zu werden, wurden die Virusinfektion und die Virusvermehrung in einen Bereich übertragen, in dem die lichtmikroskopische Vitalanalyse ebenfalls möglich ist, der aber gleichzeitig rascher und exakter reproduzierbar ist. Keimlingsinfektionen an Samsun- und White Burley-Tabak erwiesen sich als methodisch durchführbar und nicht letal (vgl. Melchers u. Schramm 1940). Die Vitaluntersuchungen von Keim- und Folgeblättern und von Wurzeln nach totaler Wasserinfiltration waren möglich. Die bislang zahlenmäßig nur in bescheidenem Rahmen durchführbaren Virusinfektionen waren nun mit geringer Raumbeanspruchung in Pikierschalen an 60 bis 80 Tabakpflanzen durch Masseninokulation mit möglichst gleichbleibender Methode und gleichem Virusmaterial quantitativ zu sichern und durch rasche Folge der Saatgutanzuchten auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hin zu überprüfen.

Abb. 1. Pikierschale mit Samsun-Tabak nach Keimlingsinfektion: gesät 2. 7. 1957, pikiert 10. 7., inokuliert 10. 7. TMV G 7, Photo vom 30. 7.: untere beiden Reihen Kontrollpflanzen; zwei Pflanzen der 2. Reihe (rechts) zeigen keinen Infektionserfolg. (Ein Drittel der Natur.)

Weitere Vorteile der Keimlingsinfektion sind:

1. Bestimmbarkeit des Infektionstermins und damit Präzisierung entwicklungsgeschichtlicher Untersuchungen (Entwicklungsgeschichte der Viruseinschlußkörper und Entwicklungsablauf der Virusschädigung in der Zelle).

2. Virusvermehrung und Zellschädigung auf kleinstem Raum, der lichtmikroskopisch überschaubar und analysierbar ist.

3. Sichere Unterscheidungsmöglichkeit der virusinfizierten Pflanzen und der Kontrollen (oder nicht erfolgreich infizierter Pflanzen) auf Grund der starken Wachstumsdifferenzen (Abb. 1).

4. Kontinuierliche Arbeitsmöglichkeit unabhängig von den Jahreszeiten, da die Keimfähigkeit des Tabaks auch während des Winters uneingeschränkt ist, während die weitere Aufzucht des Tabaks Schwierigkeiten macht. (Gewächshausbedingungen: Durchschnittstemperaturen je nach der Jahreszeit zwischen 18—22° C wechselnd; keine zusätzliche Beleuchtung während der Wintermonate.)

Im einzelnen wurde wie folgt verfahren: Gesunde Tabakanzuchten wurden im Keimlingsstadium bei stets gleichbleibender Keimblattlänge von 2 bis höchstens 4 mm in Tonschalen in acht Reihen zu 8, 9 oder 10 Pflanzen mit äußerster Vorsicht pikiert. Inokuliert wurde entweder unmittelbar nach dem Pikieren oder einen Tag später. Die Inokulation beider Keimblätter erfolgte mit dem Preßsaft virusinfizierter Tabakblätter der drei TMV-Stämme unter Verwendung von Karborundpulver mit Hilfe von Glasspateln durch vorsichtiges Auftupfen der Viruslösung; anschließend wurde überbraust. Das Karborundpulver kann vermieden werden, steigert aber die Infektionsrate bei den haarlosen Keimblättern. Aus dem gleichen Grund wurde mit unverdünntem Pflanzenpreßsaft gearbeitet, da die Menge an aufgebrachter Viruslösung an sich schon minimal ist und keiner der verwendeten TMV-Stämme auf Samsun- oder White Burley-Tabak letal wirkte. Sechs Reihen der pikierten Keimpflanzen einer Tonschale wurden mit dem TMV-haltigen Preßsaft jeweils eines Stammes inokuliert, die restlichen zwei in gleicher Schale und gleichem Erdreich stehenden Reihen wurden in methodisch gleicher Weise mit dem Pflanzenpreßsaft gesunder Tabakpflanzen inokuliert und dienten zur Kontrolle (Abb. 1). Die Virusinokulationen führten mit geringen Ausnahmen zur Infektion. Mißerfolge werden dabei am ungestörten Wachstum der inokulierten Keimpflanzen bald bemerkbar wie auch unbeabsichtigte Fremdinfektion der Kontrollpflanzen durch bald einsetzende Wachstumshemmung. Fremdinfektionen erfolgten unter den beschriebenen Versuchsbedingungen bei sauberem Arbeiten und Reinhaltung des Gießwassers nur selten. Wenn nach längerem Wachstum eine Fremdinfektion durch gegenseitige Berührung der virusinfizierten und der virusfreien Pflanzen in den Pikierschalen zu befürchten war, hatten die Untersuchungen schon aus anderen Gründen ihren Abschluß gefunden.

Blattentwicklung keimlingsinfizierter Tabakpflanzen:

Über die Blattentwicklung des Tabaks unter normalen Bedingungen arbeitete A v e r y (1933 a u. b). Durch die Virusinfektion wird sie in charakteristischer, stets gleichverlaufender Weise modifiziert. Keimlingsinfizierte Samsun- und White Burley-Tabakpflanzen bringen in fast allen Fällen normale Primärblätter hervor. Offensichtlich liegt die Primärblattanlage zur Zeit der Primärinfektion schon so weit vor, daß eine Beeinflussung nicht mehr möglich ist, zumal eine gesteigerte Virusvermehrung und die systemische Erkrankung der Pflanze erst später einsetzen und das TMV nach Literaturangaben kaum in die Meristeme eindringt (B a w d e n u. P i r i e 1946, L i m a s s e t u. C o r n u e t 1950). Ganz anders ist die Sekundärblattentwicklung (2. Folgeblatt), die in stärkstem Maße und in auffälliger Weise gestört ist (Abb. 2).

Bei allen drei TMV-Stämmen, am stärksten bei den Gelbstämmen, kommt es zu einer Reduktion der Lamina, so daß schmallineale bis rankenförmige Blätter entstehen. Die Reduktion der Blattlamina beim Samsun-

tabak wird von der am White Burley-Tabak noch erheblich übertroffen, wobei das Längenwachstum nur geringfügig geschwächt ist. Die Spreitenbildung der weiteren Folgeblätter ist dann wieder normal, abgesehen von den unterschiedlich starken Deformationen, die man an spätinfiziertem Tabak auch findet. Die in dieser auffälligen Weise stark geschädigten Sekundärblätter keimlingsinfizierter Tabakpflanzen stellten in der Hauptsache die Untersuchungsobjekte für alle cytologischen Fragen. Daneben wurden die systemisch infizierten Primärblätter untersucht. Das Studium der Primärinfektion erfolgte an den Keimblättern selbst. Die Keimlingsuntersuchungen wurden stets von der unterseitigen Epidermis her vorgenommen, da die Zellen der oberen Epidermis durch die Inokulation mit dem Karborundpulver teilweise verletzt und traumatisch gereizt sind. Wegen der leichteren Anzucht und der geringeren Blatt- und vor allem Blattstieldicke ist der Samsuntabak dem White Burley-Tabak bei allen Untersuchungen vorzuziehen. Alle Untersuchungen an Wurzeln, Keim- und Folgeblättern erfolgten an Stück- oder Totalpräparaten wie im Blütenbereich. Die Ermittlung der virusinfizierten Zellen in diesen Frühstadien der Infektion erfolgte in Ermanglung eindeutiger anderer Symptome ausschließlich auf Grund der Viruseinschlußkörper.

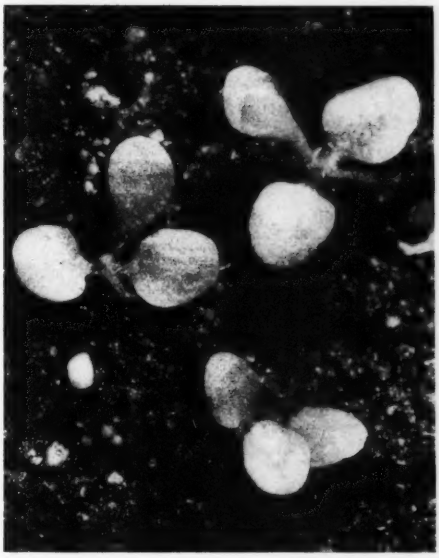


Abb. 2. Keimlingsinfizierter Samsun-Tabak: gesät 24. 4. 1957, pikiert 4. 5., inokuliert 4. 5. TMV G 2, Photo vom 28. 5.: normale Primärblattentwicklung, gestörte Sekundärblattentwicklung. Vergr. 3×.

Optische Ausrüstung: Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen stand ein Ortholux der Firma Leitz zur Verfügung (Okulare 6× und 10×, Immersionsobjektiv 100 : 1, n. A. 1,30). Die Herstellung der Mikrophotographien erfolgte mit einer Leica I c in Verbindung mit dem Mikroansatz Mikas der Firma Leitz.

Die polarisationsmikroskopischen Untersuchungen wurden mit dem Polarisationsmikroskop CM von Leitz in Verbindung mit einer Mikroskopierbogenlampe von Zeiss-Winkel durchgeführt (Okulare 6× und 8×, Immersionsobjektiv 100 : 1, n. A. 1,30). Gipsplättchen rot I. Ordnung als Kompensator.

Methodische Angaben zu den elektronenmikroskopischen Teilen der Arbeit erfolgen an den entsprechenden Stellen im Text.

Entwicklungsgeschichte, Morphologie und Struktur der Schleifen

Unter den Einschlußkörpern des TMV sind die X-Körper und die hexagonalen Prismen am gründlichsten untersucht. Zusammenfassende Darstellung bei Bawden (1950). Die fibrillären Formen des TMV dagegen finden nur sehr spärliche Erwähnung (Klebahn 1928: Fadenbündel; Smith 1930: Raphiden; Kassanis und Sheffield 1941: Spindeln, Nadelhaufen, spike-like bodies = Spieße, long coiled fibres = gewundene Fibrillen). Eine gründliche Bearbeitung dieser Formen erschien daher wünschenswert. Auf Grund gewisser morphologischer Ähnlichkeit wurden die in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung kommenden „Schleifen" (Abb. 3)

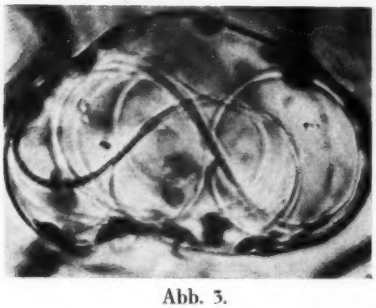


Abb. 3.

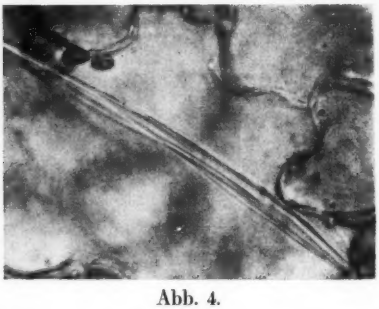


Abb. 4.

Abb. 3. Schleifen im Keimblattmesophyll. Vergr. 1050×.
Abb. 4. Fadenbündel in der Folgeblattepidermis. Vergr. 625×.

zunächst mit den von Kassanis und Sheffield (1941) beschriebenen Einschlußkörpern (Abb. 4), vor allem mit den stark gewundenen, identifiziert.

Eingehenderes Studium im weiteren Verlauf der Arbeit zeigte so grundsätzliche Unterschiede zwischen den beiden Formenkreisen, daß eine Abtrennung aller Schleifenformen von den bisher beschriebenen fibrillären Einschlußkörpern des TMV als notwendig erschien. Ihrer Sonderstellung wegen wurden daher die Schleifen bevorzugt berücksichtigt, die übrigen fibrillären Einschlußkörper des TMV, die unter der Bezeichnung „Fadenbündel" (Klebahn 1928) zusammengefaßt werden sollen, kamen nur vergleichsweise mit zur Untersuchung.

Vorkommen und Bildungsbedingungen der Schleifen

Unter den zur Verfügung stehenden TMV-Stämmen war ausschließlich und allein der Gelbstamm G 2 in der Lage, die Schleifenbildung in den infizierten Zellen hervorzurufen. Der Grünstamm TMV-Vulgare und der Gelbstamm G 7 versagten in allen Fällen, trotz ständig durchgeführter Paralleluntersuchungen. Die Schleifenbildung wurde an Samsun- und White Burley-Tabak untersucht. Sie erfolgte nach G 2-Inokulation in beiden Fällen. Es wurde aber für die cytologischen Untersuchungen der raschwüchsigere Samsuntabak bevorzugt. In den Geweben der Laubblätter des

oberen Sproßbereichs und in den Kelchblättern wurden Schleifen in Handschnitten festgestellt. Alle weiteren Untersuchungen wurden an wasserinfiltrierten Blütenteilen durchgeführt. Schleifen wurden im anthocyanhaltigen Corollenteil und im ungefärbten, oberen Tubusteil der Blüte beobachtet, und zwar in beiden Epidermen (Abb. 5 und 6), einschließlich der Haarzellen und (selten) der Schließzellen der Spaltöffnungen und dem schwammparenchymartig ausgebildeten, wenigschichtigen Mesophyll.

Seit der Entdeckung der Schleifen in den Blütenblättern im September 1955 wurden dieselben in fast ununterbrochener Folge von protokollarisch festgelegten Untersuchungen bis August 1957 beobachtet. Die

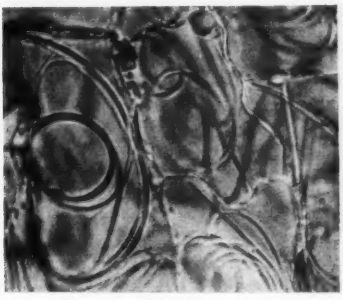


Abb. 5.

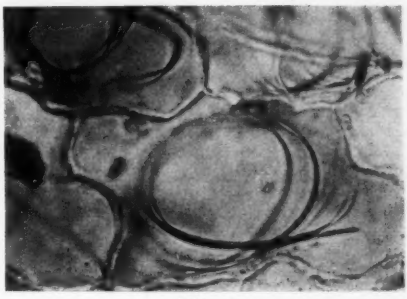


Abb. 6.

Abb. 5. Schleifen in den Epidermiszellen der Blütenblätter. Vergr. 575×.
Abb. 6. Schleifen nach optimaler Fixation (Altmann). Vergr. 750×.

Schleifenbildung erfolgte während der jahreszeitlichen Schwankungen von Licht und Temperatur in stets gleicher Weise. Das Vorkommen der Schleifen in Blüten G 2-infizierter Freilandpflanzen ist für Sept.—Okt. 1955 belegt. Eine Abhängigkeit der Bildungsweise von Licht und Temperatur, wie sie Kassanis und Sheffield (1941) für fibrilläre Einschlußkörper in Anspruch nehmen, ist daher für die Schleifen zumindest nicht festzustellen. Für diese Annahme sprechen auch alle weiterhin durchgeführten Untersuchungen über die Schleifenbildung in keimlingsinfizierten Tabakpflanzen.

Seit dem ersten Schleifennachweis im Keimblattgewebe Juni 1956 wurden in nicht weniger als 16 sukzessive bis September 1957 durchgeführten Keimlingsinfektionsserien mit wenigstens je 48 Pflanzen die Schleifen protokollarisch belegt. Sie treten in den zuerst sich entwickelnden Folgeblättern regelmäßig auf, in den Keimblättern erscheinen sie nur unregelmäßig. In den später angelegten Folgeblättern sind die Schleifen meist zugunsten der Fadenbündel zurückgetreten. In den Folgeblättern und den primärinfizierten Keimblättern kamen die Schleifen in beiden Epidermen, in Drüsen- und Deckhaaren, selten auch in den Schließzellen der Spaltöffnungen, im Palisadengewebe und im Schwammparenchym vor.

Von besonderer Bedeutung im Hinblick auf die Bildungsbedingungen ist der mehrfach wiederholte Nachweis der Schleifen in der Rhizodermis und dem Rindenparenchym der Wurzeln, was die Lichtunabhängigkeit der

Schleifenbildung unterstreicht. Auch im Hypokotyl wurden Schleifen aufgefunden.

Angesichts der weiten Verbreitung der Schleifen in der Pflanze und bei dem Vorkommen in den verschiedensten Geweben entsteht leicht der Eindruck, als ob die Schleifen in jeder G 2-infizierten Pflanze und immer anzutreffen wären. Das ist durchaus nicht der Fall. Wie im einzelnen aus den Abschnitten über die Morphologie und den Formwechsel der Schleifen verständlich wird, darf man bei der Labilität der Schleifen und ihrer Abhängigkeit vom Entwicklungszustand und Alter des Pflanzenorgans nicht erwarten, daß sie stets zum Zeitpunkt der Untersuchung noch vorhanden sind. Bei den Untersuchungen an Blüten hat sich herausgestellt, daß durch die Ungleichheit des Infektionstermins in dem systemisch infizierten Bereich der Pflanze der günstigste Zeitpunkt für den Nachweis der Schleifen von Blüte zu Blüte wechselt. Auf Grund ständiger cytologischer Kontrolluntersuchungen auf Schleifenvorkommen kann man die vielleicht allgemein gültige Regel aufstellen, daß in den normalerweise spätinfizierten Blüten zu Beginn einer Blühperiode mit großer Wahrscheinlichkeit Schleifen nachweisbar sind. In den frühzeitig infizierten Blüten der Voll- und Hauptblüte dagegen treten die Schleifen immer mehr zugunsten hexagonaler Prismen zurück; sie sind jedoch bei Knospenuntersuchungen auch hier noch nachweisbar, aber nicht mehr in der Ausschließlichkeit wie in der Erblühungsphase der Pflanze. Bei der Blühabfolge von Seitentrieben, die schon lange latent virusinfiziert sein können oder erst mit erfolgendem Austrieb systemisch infiziert werden, sind ähnlich unterschiedliche Verhältnisse gegeben: jedoch überwiegen frühinfizierte Blüten, und der Schleifennachweis gelingt seltener.

Da nur bei einer entsprechenden Kenntnis über das Vorkommen und die Bildungsbedingungen der Schleifen in der virusinfizierten Pflanze die cytologischen Untersuchungen an ihnen reproduzierbar sind, baut sich alles, was im weiteren Verlauf der Arbeit über die Schleifen ausgesagt wird, auf den hier und im methodischen Teil gegebenen Grundlagen auf.

Morphologie der Schleifen

Das morphologische Bild der Schleifen in den virusinfizierten Zellen ist von großer Mannigfaltigkeit. Bei den hier zur Betrachtung herangezogenen Formen handelt es sich um Schleifen, die nach Abschluß ihrer Entwicklung die Wirtszellen weithin erfüllen (Abb. 3, 5 und 6). Die Dicke der Schleifen ist sehr variabel und geht von der Grenze der lichtmikroskopischen Sichtbarkeit um 0,4 μ bis herauf auf 2,5 μ (in Sonderfällen bis 5 μ). Die Hauptmenge der Schleifen weist eine Dicke um 1 μ auf. Die Länge der Schleifen kann recht ansehnlich sein; in den langgestreckten Zellen des Schwammparenchyms werden 200—250 μ mehrfach geradlinig nach jeweiligem Kehren durchlaufen. Die Schleifen sind normalerweise auf ganzer Länge von gleicher Dicke und trotz unterschiedlicher Krümmungen optisch homogen. Optische Querschnitte der Schleifen zeigen runde, abgeplattete oder halbmondförmige Profilbilder.

Die größte Variabilität im morphologischen Aspekt wird durch die unterschiedliche Erhaltung der im Frühstadium der Entwicklung erfolgten Spiralisierung und Aufwindung der Schleifen erreicht. Der Erhaltungsgrad der Spiralisierung der Schleifen ist in starkem Maße von den räumlichen Gegebenheiten der Wirtszelle abhängig. In den mehr kubischen Epidermiszellen ist er groß: der zur Verfügung stehende Raum wird in Kugel- oder Ellipsoidform locker erfüllt. In den schlauchförmig langgestreckten Zellen des Schwammparenchyms und in Haarzellen ist der Erhaltungsgrad der

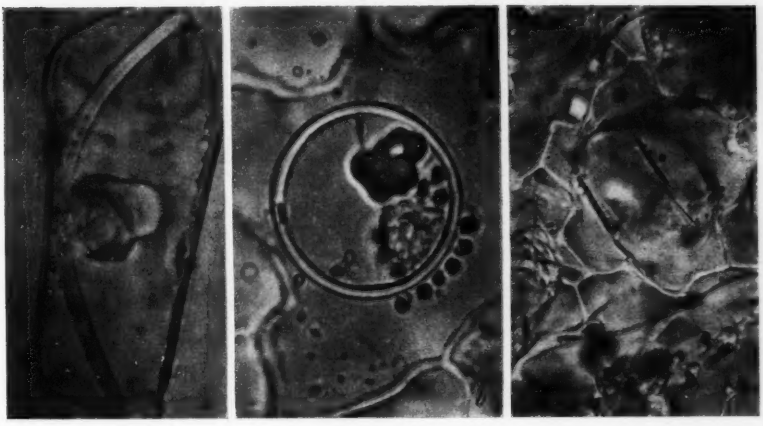


Abb. 7 *a*, *b* und *c*. *a* Durch Verschmelzung entstandene bandförmige Schleife. Vergr. 1160×. *b* Reifen in Aufsicht. Vergr. 1400×. *c* Reifen im optischen Querschnitt (Profilbild). Vergr. 850×.

Aufwindung dagegen gering, da eine Ausdehnung in einer Richtung in hohem Maße begünstigt wird. Es erfolgt eine Längsausbreitung, die mit einer Parallelisierung der Schleifen verbunden ist. Man findet daher in diesen Zellen oft ganze Bündel aus vielen mehr oder weniger längsverlaufenden Einzelschleifen. Als Verschmelzungsformen treten hier bevorzugt „Bänder" auf (Abb. 7 *a*).

Durch die Verschmelzung von parallelisierten Einzelschleifen wird der morphologische Aspekt erheblich erweitert. Daß eine Verschmelzung erfolgt, wird durch die Fülle der immer wieder beobachteten Übergangsformen mit lokaler Verschmelzung bewiesen. Durch den Vorgang der Verschmelzung werden auch Sonderformen der Schleifenausbildung wie die „Ringe" und „Reifen" und die schon erwähnten „Bänder" verständlich (Abb. 7 *a*, *b* und *c*). „Ringe" und „Reifen" sind in ihren gleichartig kreisrunden Aufsichtsbildern nicht exakt zu unterscheiden. Im optischen Querschnitt zeigen Ringe normale Schleifenprofile, die Reifen dagegen zwei parallele Strecken, wie sie beim achsenparallelen Schnitt eines Zylindermantels entstehen (Abb. 7 *c*). Die Reifen zeigen eine große Variationsbreite

(Durchmesser 10—25 μ; Breite bei Profilansicht 2—18 μ) und sind durch Übergänge mit den Ringen verbunden. Es zeigt sich in fast allen Fällen, daß der Durchmesser der Ringe und Reifen kleiner ist als der der Zelle und damit der Krümmungsgrad nicht von den räumlichen Gegebenheiten der Wirtszelle abhängt.

Dem weiteren Verständnis des morphologischen Aspekts dienen die Abschnitte über die Struktur und die Entwicklungsgeschichte der Schleifen.

Entwicklungsgeschichte der Schleifen

Untersuchungen zur Entwicklung der Schleifen wurden zuerst im Blütenbereich, später auch im Keim- und Folgeblattbereich frühinfizierter Tabakpflanzen unternommen. Die Wahrscheinlichkeit, Schleifenfrühstadien im Blütenbereich zu finden, wächst, je mehr man den Untersuchungstermin zum Blühbeginn hin verlegt; das gilt für die systemisch infizierte Einzelblüte wie für die Gesamtpflanze. Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen im Keimlingsbereich sind durch die ungefähr mögliche Bestimmbarkeit des Infektionstermins und durch die Wahrscheinlichkeit der Schleifenbildung in den ersten Folgeblättern weitgehend von Zufälligkeiten befreit und wurden daher gegenüber den Blütenuntersuchungen bevorzugt. Von entscheidender Wichtigkeit für alle entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen an Viruseinschlußkörpern ist und bleibt der günstige Untersuchungszeitpunkt — Konstanz von Material und Methode vorausgesetzt.

Die Entwicklung der Schleifen wurde in Keim- und Folgeblättern nach Keimlingsinfektion mit TMV G 2 untersucht. In den Geweben der Blattunterseite der primärinfizierten Keimblätter waren Prismen nach 3, Schleifen nach 4 Tagen frühestens nachweisbar, wobei eine deutliche Zunahme nach Menge und Verbreitung der Schleifen in älteren Infektionsstadien festzustellen ist. In den Primär- und Sekundärblättern gelingt der Schleifennachweis erst erheblich später, da diese Organe zum Zeitpunkt der Inokulation noch nicht sichtbar sind und erst später unter den ungünstigen Bedingungen der Infektion sich langsam entwickeln müssen. Immerhin sind frühestens nach 10 bis 12 Tagen in den regelmäßig untersuchten Sekundärblättern Schleifenentwicklungsstadien anzutreffen, in den Primärblättern entsprechend etwas eher. Auch hier setzt eine erfolgreichere Beobachtungsmöglichkeit und Zunahme der Schleifen nach Menge und Verbreitung in etwas älteren Infektionsstadien ein. Dasselbe gilt für alle während der ungünstigen Jahreszeiten (Spätherbst und Winter) durchgeführten Untersuchungen.

Für den Keimlings- und Blütenbereich ergibt sich in völliger Übereinstimmung:

1. Die gesamte Schleifenentwicklung findet in einem cytoplasmatischen Bereich der Zelle statt; dieser tritt in Form der cytoplasmatischen Ballung charakteristisch in Erscheinung (Abb. 8 *a*). Das Cytoplasma ist außerordentlich dicht und in Frühstadien reich an stark lichtbrechenden Partikeln. Vakuolen fehlen oder treten nur in geringem Maße auf. Von den Zellorganellen sind zahlreiche Plastiden im peripheren Bereich der Cytoplasma-

ballung, bisweilen auch in den Cytoplasmasträngen zu erkennen. Der meist geschwollene Kern liegt stets zentral und ist unter vitalen Bedingungen oft nur an den auffällig vergrößerten Nukleolen eindeutig zu lokalisieren.

2. In der cytoplasmatischen Ballung bilden sich feinfibrilläre, stark gewundene Aggregate. Mit der einsetzenden Erstarkung der Fibrillen zu zarten Schleifen ist eine Ausdehnung derselben verbunden, so daß die jungen Schleifen in den peripheren Bereich der Plasmaballung verlagert werden (Abb. 8 *b*). Es erfolgt eine Spreizung und dann eine Sprengung der cytoplasmatischen Umhüllung. Im charakteristischen Endstadium der Entwicklung erfüllt die Schleife die ganze Wirtszelle (Abb. 3 und 5).

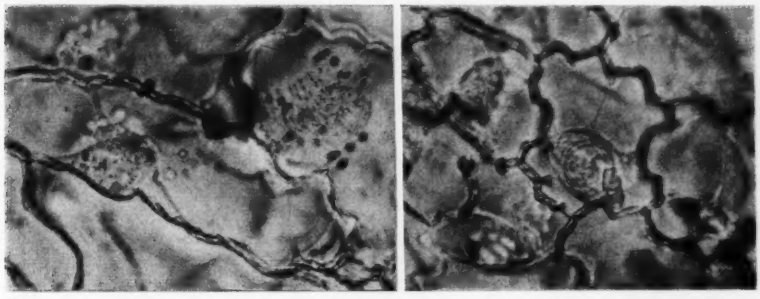


Abb. 8 *a* und *b*. *a* Schleifenentwicklung aus cytoplasmatischen Ballungen im Blütenbereich. Vergr. 700×. *b* Schleifenfrühstadium. Vergr. 600×.

3. Mit der Schleifenentwicklung geht ein Materialverbrauch der cytoplasmatischen Ballung parallel, so daß meist nur wenig Restsubstanz verbleibt. In den Fällen, in denen stärkere Plasmamengen in der Umgebung des Kerns verbleiben, werden im Anschluß, oft auch schon während der peripheren Schleifenlage prismatische Viruseinschlußkörper gebildet. Sie erscheinen in Form kleiner Blöcke, die sich zunehmend und rasch vereinigen und als einheitliche Körper aus dem plasmatischen Bezirk herausgedrängt werden. Eine Vergesellschaftung von Schleifen und Prismen ist eine normale Erscheinung in der Zelle.

4. Die Entwicklung der Schleifen ist ein an die Einzelzelle gebundener Prozeß, der mit der Infektion und der Virusvermehrung in der Zelle einsetzt und unabhängig von den übrigen Zellen der Nachbarschaft gleichen oder andersartigen Gewebes abläuft. Unterschiedliche Entwicklungsstadien finden sich oft unmittelbar nebeneinander. Erst im Stadium der Gesamterfüllung der Wirtszelle findet eine Angleichung untereinander statt. Alle Befunde im Blütenbereich sprechen für einen recht frühzeitig einsetzenden und raschen Ablauf der entwicklungsgeschichtlichen Vorgänge.

5. Die in der Literatur so oft erwähnten X-Körper (Goldstein 1924, 1926 und Zech 1932) wurden in Übereinstimmung mit den Befunden von Kassanis u. Sheffield (1941) auch bei der Gelbstamm-Infektion (TMV G 2) beobachtet. X-Körper traten jedoch bei dem Gelbstamm G 2 nur selten auf; ihnen kommt daher in der Entwicklungsgeschichte der Schlei-

fen keine Bedeutung zu. Auch in der Entwicklung der hexagonalen Prismen sind X-Körper nicht unbedingt notwendig; hexagonale Prismen können unmittelbar ohne Auftreten eines X-Körper-Stadiums im Cytoplasma erscheinen. Bei dem überwiegend untersuchten Stamm G 2 war das fast stets der Fall.

6. Labilität äußeren Einflüssen gegenüber zeigen nicht nur die fertigen Schleifen, sondern in erhöhtem Maße auch alle Entwicklungsstadien. Dabei wird das Schleifenmaterial lokal oder total in prismatische Aggregate verwandelt (Näheres siehe unter Formwechsel der Schleifen).

Formwechsel der Schleifen und Fadenbündel

Der Formwechsel der Schleifen ist von der bereits beschriebenen Formenvariabilität der Schleifen zu unterscheiden. Unter Formwechsel ist die Umlagerung des in den Schleifen vorhandenen Virusmaterials zu kristallinen Aggregaten bis zur Ausbildung von Prismen zu verstehen.

Natürlicher und experimenteller Formwechsel der Schleifen

Bei der lichtmikroskopischen Beobachtung von schleifenhaltigen Blütengeweben fiel es immer wieder auf, daß einige wenige Zellen ausschließlich Prismen enthielten; in gleicher Weise wurden vereinzelt schleifenhaltige Zellen in einer nur prismenhaltigen Umgebung angetroffen. Daß sich das Virusmaterial in zwei verschiedenen Formen darbietet, die sich ersetzen oder ineinander übergehen können, war die naheliegende Vermutung. Im Grenzbereich zwischen vorwiegend schleifenhaltigen Geweben und prismenreichen Bezirken gelang es nun, Zellen zu entdecken, deren Schleifen in auffälliger Weise mit Prismen in Beziehung standen (Abb. 9 *b*).

In weiteren Untersuchungen wurden auch die entsprechenden morphologischen Frühstadien gefunden (Abb. 9 *a*), die Hinweise für eine sukzessive Umlagerung von Schleifenmaterial zu prismatischen TMV-Aggregaten liefern. Dabei ergab sich im einzelnen:

1. Die Prismenbildung beginnt in engem Kontakt mit der Schleife in Form stark lichtbrechender Stäbchen; diese liegen quer zum Längsverlauf der Schleife. Die Länge der Stäbchen entspricht zunächst der Schleifenbreite ihre Dicke liegt bei 0,3—0,6 μ (Abb. 9 *a*).

Da das TMV nach elektronenmikroskopischen Befunden etwa die Länge von 300 mμ besitzt, würde die Stäbchendicke der einfachen bzw. der doppelten Länge längseitig parallel gelagerter TMV-Partikeln entsprechen.

2. Das Wachstum der Stäbchen senkrecht zum Schleifenlängsverlauf führt über die Schleifendicke hinaus und kommt dann zum Stillstand; die Zunahme in Richtung des Schleifenlängsverlaufs erfolgt unregelmäßig und unterschiedlich schnell. Die starke Lichtbrechung der Stäbchen verschwindet mit der Anlagerung weiteren Virusmaterials. Eine Schichtung der entstehenden prismatischen Aggregate senkrecht zum Schleifenlängsverlauf wird zum Teil sichtbar.

3. Der endgültige Verbrauch des Schleifenmaterials erfolgt langsamer. Zunächst bestehende Unterschiede in der Schichtenlänge, die sich in unruhiger Kantenausbildung der Prismen äußern, werden ausgeglichen. Eine

Verwachsung der Einzelprismen tritt ein, soweit das bei der Krümmung der Schleife möglich ist (Abb. 10).

Ganz allgemein läßt sich sagen: Der Formwechsel der Schleifen verläuft nur in einer Richtung und führt im Normalfall zur Bildung prismatischer

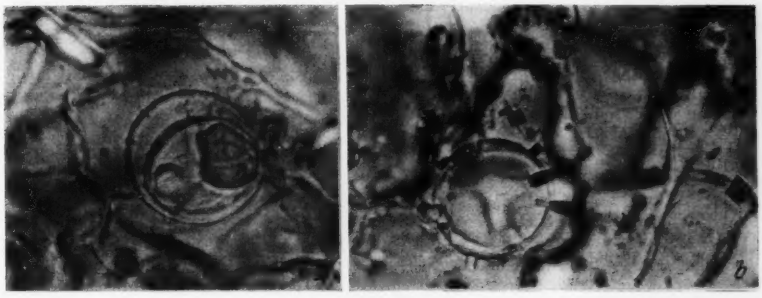


Abb. 9 *a* und *b*. *a* Schleife mit beginnender Umlagerung zu prismatischen Aggregaten quer zum Schleifenlängsverlauf. Vergr. 800×. *b* Fortgeschrittenes Stadium. Vergr. 730×.

TMV-Aggregate. Der Vorgang ist irreversibel. Der natürliche Formwechsel der Schleifen hebt die Vergesellschaftung unterschiedlicher Viruseinschlußkörper in ein und derselben Zelle zugunsten einer Form auf. Er erklärt ferner viele Unregelmäßigkeiten des Schleifenvorkommens in den verschiedenen Geweben und bei unterschiedlichem Infektionsalter. Die Umlagerungen sind der charakteristische Ausdruck der Labilität der Schleifen. Sie sind überall da möglich, wo Schleifen auftreten. Sie wurden in Wurzeln, Keim- und Folgeblättern sowie in Blüten in stets gleicher Weise beobachtet; unterschiedlich ist nur das erreichte Endstadium. Umlagerungen sind in allen Frühstadien der Schleifenentwicklung anzutreffen. Sie lassen sich ferner experimentell auslösen. Zur Durchführung der experimentellen Schleifenumlagerung sind folgende methodische Einzelheiten erwähnenswert:

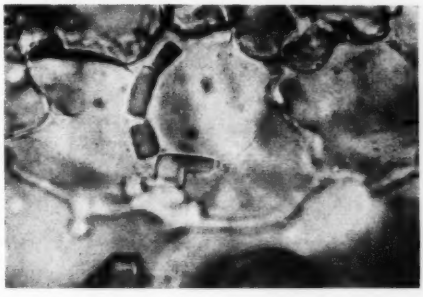


Abb. 10. Spätstadium der Schleifenumlagerung. Schleife fast vollständig durch Prismen ersetzt. Vergr. 800×.

1. Es erfolgte grundsätzlich in jedem Falle vor der Untersuchung die lichtmikroskopische Kontrolle des wasserinfiltrierten Blütenmaterials auf Schleifenvorkommen. Eine durch die Wasserinfiltration ausgelöste Umlagerung wurde nie beobachtet. 2. Für die Versuche kamen nur Blütenblätter in Frage, in denen die Schleifen die Hauptvirusform darstellten und Prismen zurücktraten. 3. Zur Unter-

suchung kamen nur größere Gewebebezirke. Wegen der an den Schnitträndern auftretenden Schleifenumlagerungen liefern nur Versuche an Zellen im zentralen Teil größerer Gewebebezirke einwandfreie Ergebnisse. 4. Bei der Zergliederung der Blüte wurde darauf geachtet, daß die entstehenden Stücke möglichst geringe Krümmungen aufwiesen. Nur so läßt sich der schädigende Deckglasdruck vermeiden. 5. Wegen der Hinfälligkeit der Blütengewebe wurden möglichst nur junge Blüten und diese nur frisch untersucht.

Behandlung der Schleifen mit Alkalien [0,5 mol KOH und $Ca(OH)_2$]: Alkalien, auch in schwacher Konzentration, dringen außerordentlich rasch in die Zelle ein, was am Anthocyanfarbumschlag von Rot nach Blau festzustellen ist. Die günstige Ausgangskonzentration schwankt und ist in Vorversuchen zu ermitteln. Die eindringenden Alkalien rufen in den Bezirken, in denen es nicht zum Zerfall der Schleifen kommt, eine Umlagerung mindestens bis zum Stäbchenstadium hervor. Die Wirkweise des Calciumhydroxyds ist zögernder und schonender als die der Kalilauge; in der Wirkung selbst stimmen die beiden überein (Abb. 11).

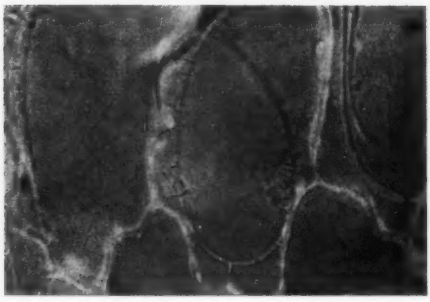


Abb. 11. Mit Hilfe von 0,5 mol $Ca(OH)_2$ experimentell ausgelöste Schleifenumlagerung zu stäbchenförmigen TMV-Aggregaten in Kontakt mit der Schleife. Vergr. 875×.

Plasmolyseversuche mit 0,6—1 mol $CaCl_2$, KNO_3 und KSCN: Plasmolyseversuche (Methode siehe Strugger 1949) wurden mit den angegebenen Plasmolyticis an Blütenblättern durchgeführt. Da die osmotischen Werte von Blütengeweben während der Anthese gewöhnlich sinken (Bancher 1932), müssen die günstigen Konzentrationen der Plasmolytica für die Untersuchung in einer Verdünnungsreihe ermittelt werden. Die Plasmolyseversuche mit $CaCl_2$ und KNO_3 verliefen in normaler Weise bis zum entsprechenden Plasmolyseendstadium, ohne daß nennenswerte Veränderungen an den Schleifen festzustellen waren.

Die präletale Plasmolyse mit KSCN (Strugger 1932) führte dagegen fast regelmäßig zur Umlagerung der Schleifen. Die Plasmolyse verläuft über ein kurzes Konkavstadium rasch zur Konvexform. Die Umlagerung setzt oft erheblich vor der ersten Abhebung des Protoplasten von der Zellwand ein; sie verläuft in völlig gleicher Weise wie die natürliche und führt über das Stäbchenfrühstadium meist rasch zur Bildung prismatischer Aggregate (Abb. 12 *a* und *b*).

Infolge der Salzintrabilität bei KSCN-Behandlung der Zellen stellen sich im Laufe der Plasmolyse Cytoplasmaschäden ein, so daß der weitere Prismenaufbau unterbleibt.

Als das wesentlichste Ergebnis des experimentellen Formwechsels der Schleifen ist die völlige Übereinstimmung in Richtung und Ablauf mit dem natürlichen Formwechsel und damit die völlige Sicherheit der morphologischen Befunde zu werten. Eine Erklärung und Begründung des natürlichen Formwechsels auf Grund seiner experimentellen Reproduzierbarkeit erscheint aber angesichts der komplizierten Verhältnisse, die schon in viel einfacheren Viruslösungen bestehen (B a w d e n 1950, S. 42 ff., und S c h r a m m 1954, S. 139 ff.), nach dem derzeitigen Stand unserer Kenntnisse noch verfrüht.

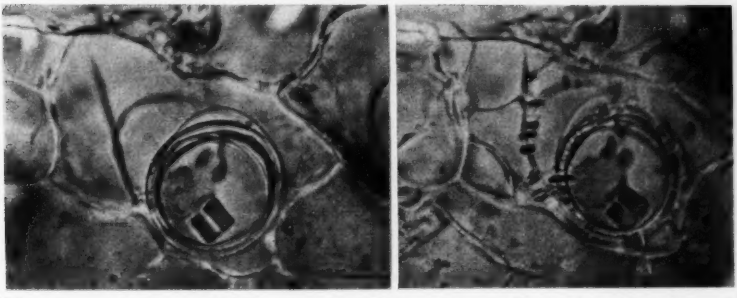


Abb. 12 *a* und *b*. *a* Schleife vor der Plasmolyse. *b* Nach dem Einsetzen der Plasmolyse mit 1 mol KSCN. Unregelmäßige Anordnung der Stäbchen senkrecht zum Schleifenlängsverlauf. Vergr. 875×.

Natürlicher und experimenteller Formwechsel der Fadenbündel

In der Einleitung wurden die bisher in der Literatur beschriebenen fibrillären TMV-Einschlußkörper, die sogenannten „Fadenbündel", von den Schleifen abgetrennt. Die Berechtigung hierfür liefert u. a. die vergleichsweise durchgeführte Untersuchung des Formwechsels der Fadenbündel. Darunter ist die Umlagerung des in den Fadenbündeln vorhandenen Virusmaterials zu kristallinen Blöckchen und Schichtkörpern zu verstehen.

Experimenteller Formwechsel: Angesichts der fast regelmäßig erfolgenden Schleifenumlagerungen bei KSCN-Behandlung war es von Interesse, das Verhalten der Fadenbündel vergleichsweise zu studieren. Die Plasmolyse wurde in methodisch gleicher Weise wie bei der Schleifenuntersuchung durchgeführt. Als Gewebe kamen jedoch nur Keim- und Folgeblätter in Frage, in deren Epidermen die Fadenbündel bevorzugt auftreten. In den Blüten wurden niemals Fadenbündel beobachtet; sie fielen daher als Untersuchungsobjekte aus. Bei Plasmolyseversuchen mit 0,6—1 mol $CaCl_2$, KNO_3 und KSCN ergab sich eine erheblich größere Resistenz der Fadenbündel im Vergleich mit den Schleifen. Spieß- oder langnadelförmige Fadenbündel erleiden zunächst keine Formveränderung, sondern ragen starr aus dem im Konvexstadium abgekugelten Protoplasten hervor. Bei längerwährender Plasmolyse kommt es zur Zellschädigung und Auflösung der Fadenbündel, wobei unter Auflockerung die feinfibrilläre Längsstruktur der Fadenbündel meist deutlich sichtbar wird. Die Auflösung nach erfolgter

Salzintrabilität ohne vorhergehende Umlagerung der Fadenbündel ist auch für die Plasmolyse mit 1 mol KSCN die Regel. In Einzelfällen jedoch

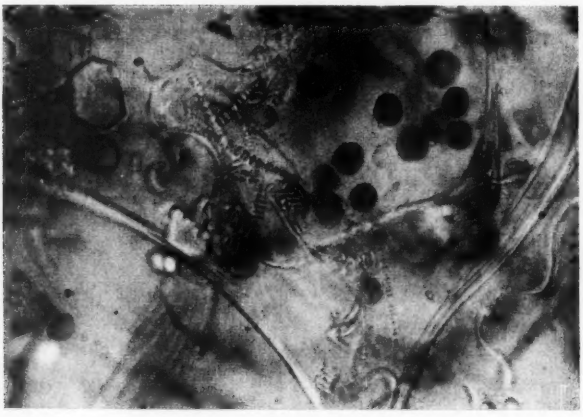


Abb. 13. Durch 1 mol KSCN experimentell ausgelöste Umlagerung der Fadenbündel zu kristallinen Blöckchen. Vergr. 800×.

kommt es zum Zerfall der Fadenbündel in eine Vielzahl kristalliner Blöckchen (Abb. 13).

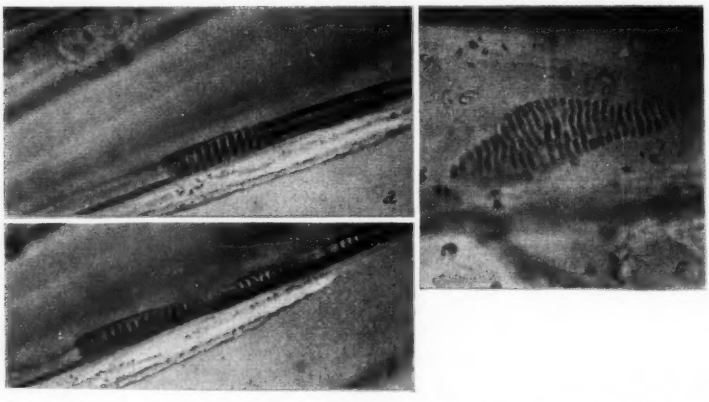


Abb. 14 *a*, *b* und *c*. Umlagerung von Fadenbündeln zu kristallinen Schichtkörpern. *a* und *b* 750×, *c* 800×.

Natürlicher Formwechsel: Bei der Untersuchung virusinfizierter Gewebe wurden wiederholt auffällig geschichtete Einschlußkörper gefunden (Abb. 14 *c*), die als Umwandlungsstadien aufzufassen waren. Es gelang dann auch, unter vitalen Bedingungen die sukzessive Umlagerung von

Fadenbündeln zu kristallinen Schichtkörpern im Folgeblattbereich mikrophotographisch festzuhalten (Abb. 14 *a* und *b*).

Die zu Beginn der Beobachtung noch feinfibrillären Fadenbündel verschmelzen zu homogenen Gebilden. Die Umlagerung wird an der schrittweise erfolgenden Ausbildung einer kontrastreichen Schichtstruktur quer zum Längsverlauf des Fadenbündels erkennbar (Abb. 14 *a* und *b*); diese Umlagerung erfolgt rasch, die weiteren Veränderungen bis zu dem Stadium in Abb. 14 *c* gehen langsam vor sich. Ein ähnlicher, aber umgekehrt ablaufender Übergang von quergestreiften Formen in längsfibrilläre Spindeln ist für die Einschlußkörper des Kakteenvirus beobachtet und beschrieben worden (Weber und Kenda 1952, Amelunxen 1957).

Der Formwechsel der Fadenbündel wird durch die überaus rasche Ausbildung einer kontrastreichen, hochgeordneten Schicht- bzw. Blöckchenstruktur unter völliger Auflösung der Fadenbündel charakterisiert. Der Formwechsel der Schleifen dagegen ist durch die unregelmäßige Ausbildung isoliert liegender, kontrastreicher Stäbchen gekennzeichnet, die langsam unter langer Erhaltung der Schleife und Verlust des Kontrastes zu großen prismatischen Aggregaten mit schwach sichtbarer Schichtung heranwachsen. Durch den unterschiedlichen Verlauf der Umlagerung ist somit eine Charakterisierung der Schleifen und Fadenbündel möglich.

Polarisationsmikroskopische Untersuchungen[3]

Eine Darstellung der polarisationsmikroskopischen Untersuchungen an dieser Stelle im Anschluß an den Formwechsel ermöglicht eine weitere Charakterisierung der Schleifen und Fadenbündel; gleichzeitig werden damit die mit dem Formwechsel verbundenen strukturellen Veränderungen der Einschlußkörper schärfer erfaßt. Polarisationsmikroskopische Untersuchungen an Viruseinschlußkörpern sind immer wieder, vor allem zur Klärung von Strukturfragen, durchgeführt worden. Über die hexagonalen Prismen erschien erst in neuerer Zeit eine Arbeit von Wilkins und Mitarb. (1950).

Über das Verhalten der Fadenbündel im Polarisationsmikroskop finden sich Angaben in der bereits genannten Arbeit von Kassanis und Sheffield (1941). Da die Ergebnisse dieser Autoren bestätigt werden können, ist eine gedrängte Darstellung der eigenen Untersuchungen möglich. Als methodische Einführung standen Rinne und Berek (1953) und Raaz und Tertsch (1939) zur Verfügung.

Alle unter der Bezeichnung „Fadenbündel" zusammengefaßten fibrillären Viruseinschlußkörper zeigen in voller Bestätigung der Angaben von Kassanis und Sheffield (1941) eine positive Doppelbrechung in bezug auf die Fadenlängsrichtung, zu der n_γ parallel liegt.

Die hexagonalen Prismen können bald tafelig nach der Basis, bald säulig nach dem Prisma ausgebildet sein. Unabhängig vom Habitus liegt n_γ

[3] Herrn Professor Dr. R. Mosebach vom Mineralogischen Institut der Universität Münster danke ich für die Durchsicht des polarisationsmikroskopischen Teils der Arbeit.

ungefähr in Richtung der Prismenkante bzw. der hexagonalen Achse (Wilkins und Mitarb. 1950). Bei der Durchstrahlung senkrecht zur hexagonalen Basis herrscht keine Doppelbrechung.

Die Schleifen zeigen durchweg keine Doppelbrechung; eine Ausnahme bilden einzelne Schleifenpartien, die in bezug auf ihren Längsverlauf negativ doppelbrechend waren. Die Schwierigkeit der polarisationsmikroskopischen Untersuchungen an Schleifen liegt darin, daß sie in der Zelle verbleiben müssen. Die Wahrnehmung einer nur schwachen Doppelbrechung wird durch die starke Doppelbrechung der Zellulosemembranen der Zelle beeinträchtigt, da sich Überstrahlungen bei der Untersuchung im Gewebeverband nicht vermeiden lassen. In den wenigen Fällen, in denen eine schwache negative Doppelbrechung von Schleifenpartien mit Hilfe des Gipsplättchens rot I. Ordnung nachweisbar war, zeigte sich schon im Lichtmikroskop eine starke Lichtbrechung der entsprechenden Schleifenabschnitte; sie wiesen ferner keine stärkeren Krümmungen auf.

Polarisationsmikroskopische Untersuchungen zum Formwechsel der Schleifen und Fadenbündel waren besonders aufschlußreich. Bei der Umlagerung der in bezug auf den Fibrillenlängsverlauf positiv doppelbrechenden Fadenbündel zu Schichtkörpern bleibt die positive Doppelbrechung in allen Phasen der Umlagerung erhalten. Im Stadium der homogenen Verschmelzung der Fibrillen ist die positive Doppelbrechung jedoch gering, mit der Ausbildung einer geordneten Schichtstruktur nimmt sie wieder zu. Auf Grund der gleichbleibenden positiven Doppelbrechung in bezug auf den Fibrillenlängsverlauf in allen Stadien der Umlagerung ist ein Aufbau der Schichten aus längsseitig parallelgeordneten Viruspartikeln im gebildeten Schichtkörper anzunehmen.

Bei den nicht oder nur abschnittsweise negativ doppelbrechenden Schleifen dagegen ist die Umlagerung mit einer Änderung im Richtungssinn und Ordnungsgrad der TMV-Partikeln verbunden. Besonders eindeutig zeigen die mehrschichtigen Stadien der Umlagerung (Abb. 9 *b* und 10) eine positive Doppelbrechung in bezug auf die senkrecht zur Schichtung verlaufende Achse. Sie entspricht völlig der positiven Doppelbrechung der hexagonalen Prismen in Profilansicht in bezug auf die hexagonale Achse. Nun ist für die hexagonalen Prismen auf Grund elektronenmikroskopischer Befunde der Schichtenaufbau aus längsseitig parallel gelagerten Viruspartikeln erwiesen (Wehrmeyer 1957). Es liegt daher nahe, auch für die 0,3—0,6 μ breiten, stäbchenförmigen Frühstadien der Umlagerung einen Aufbau aus ein oder zwei Lagen längsseitig parallelgelagerter TMV-Partikeln von ungefähr 300 mμ Länge anzunehmen.

Struktur der Schleifen

Lichtmikroskopische Untersuchungen

Die Labilität der Schleifen schränkt die Struktaruntersuchungen an ihnen erheblich ein. Chemikalien sind nur in geringem Umfang anwendbar, und die Fixation bereitet Schwierigkeiten (s. u.).

Plasmolyseversuche: Schonend verläuft die Plasmolyse mit Rohrzucker,

Glukose, $CaCl_2$ und auch KNO_3 (0,6—1 mol). Die Schleifen erweisen sich als außerordentlich flexibel; sie passen sich dem verbleibenden Raum im Plasmolyseendstadium an (Abb. 15). Sie sind ferner elastisch: Nach erfolgter Deplasmolyse nehmen sie wieder den gesamten Zellenraum ein.

Behandlung der Schleifen mit verdünnter Essigsäure (1 : 10): Bei den längsfibrillär strukturierten Fadenbündeln war es möglich, durch Einwirkung verdünnter Säuren den Aufbau aus Fibrillen auch in den Fällen lichtmikroskopisch sichtbar zu machen, in denen zunächst keine Struktur erkennbar war. Es wurde daher versucht, mit Hilfe verdünnter Essigsäure Aufschluß über die Schleifenstruktur zu erhalten. Bei der Behandlung mit verdünnter Essigsäure erfolgt eine charakteristische Entspiralisierung der gewundenen Schleifenformen; da eine Auflösung von den Schleifenenden her gleichzeitig abläuft, ist keine Strukturaufklärung möglich.

Abb. 15. Plasmolyse mit 0,8 mol KNO_3 im Blütengewebe. Vergr. 750×.

Die bereits beschriebenen Beobachtungen über den Formwechsel der Schleifen unter Bildung prismatischer Aggregate machen den Aufbau der Schleifen aus Virusmaterial sehr wahrscheinlich. Die polarisationsmikroskopischen Befunde über die negative Doppelbrechung von Schleifenabschnitten sprechen für eine quer oder schräg zum Längsverlauf der Schleifen orientierte Lage des Virusmaterials.

Elektronenmikroskopische Strukturanalyse

Material und Methode

Voraussetzung der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Viruseinschlußkörpern sind eine geeignete Fixation und eine kontrastreiche Darstellung der Viren in der Pflanzenzelle. Über die Fixation von Viruseinschlußkörpern sind in der umfangreichen Virusliteratur zahlreiche Angaben gemacht. Eine Überprüfung der z. B. von Bald (1949) und von Littau und Black (1952) angegebenen Fixiermittel jedoch zeigte, daß angesichts der Empfindlichkeit der Schleifen und bei einer cytologisch-strukturanalytischen Fragestellung nicht eines wirklich den erforderlichen Ansprüchen genügte. Umfangreiche Untersuchungen an schleifenhaltigen Blütengeweben (Samsun-Tabak) mit den verschiedensten Fixiermitteln (nach Romeis 1948) wurden daher zur Klärung der Fixationsfrage durchgeführt. Die Untersuchung von Blütenmaterial gestattet eine rasche, direkte lichtmikroskopische Kontrolle des Erhaltungszustandes der Schleifen bei verschiedenen Fixiermitteln und unterschiedlichen Fixationszeiten. Durch die Vergesellschaftung von Schleifen mit hexagonalen Prismen im Blütenbereich

kann die Untersuchung auch auf die letzteren ausgedehnt werden. In bemerkenswerter Übereinstimmung mit den Befunden von Frey-Wyssling (1935) ergab sich: saure Fixiergemische erzeugen grobe Artefakte und z. T. völlige Zerstörung (Bouin, Carnoy, Flemming, F. A. A., Nawashin): der ungünstige Einfluß speziell der Essigsäure ist angesichts der Beliebtheit essigsäurehaltiger Fixiergemische in der Viruscytologie bis heute und selbst bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen besonders hervorzuheben (Rubio-Huertos 1954, 1956; Skotland und Mitarb. 1955; Goldin und Fedotina 1956). Alle weiteren Untersuchungen beschränkten sich auf formol- oder osmiumsäurehaltige Fixiergemische.

Reines Formol (5% oder 10%) ist für die Erhaltung der Schleifen und Prismen wenig geeignet; in Gemischen wie Regaud und Lewitzky wurden dagegen mit Formol brauchbare Ergebnisse für Schleifen erzielt (Fixationszeiten 10—20 Min.). Die Beurteilung des Erhaltungszustandes hexagonaler Prismen hier und in den folgenden Untersuchungen erfolgte parallel und senkrecht zur hexagonalen Achse. Die Aufsichtsbilder sind oft befriedigend, während die Profilansichten eine nadelige Zerfallsstruktur verraten. Wegen der Unzulänglichkeit der Fixation der hexagonalen Prismen mit formolhaltigen Fixiergemischen wurden Osmiumsäure und osmiumsäurehaltige Gemische für die Fixation der Schleifen und Prismen bevorzugt.

Osmiumsäure 1% und 2%: Veronal-Natriumacetat-Puffer nach Michaelis, pH 7,2. Fixationsdauer bis zum Eintritt der totalen Gewebeschwärzung ¾ bis 2 Std.; der Schleifenerhaltungszustand ist gut; leichte Deformationen kommen vor. Hexagonale Prismen sind unterschiedlich gut erhalten. Profilansichten zeigen eine erhaltene Schichtstruktur, aber auch homogene bis feinnadelige Zerfallsformen. Die Aufsichtsbilder sind durchweg gut.

Altmann (Osmiumsäure 2% und $K_2Cr_2O_7$ 3%, 1 : 1): Fixationsdauer bis zur totalen Gewebeschwärzung (1—2 Std.). Die Schleifen sind durchweg tadellos erhalten (Abb. 6), wenn auch zerbrochene oder gelatinierte Formen hin und wieder auftauchen. Hexagonale Prismen mit erhaltener Schichtstruktur oder homogene, leicht deformierte Formen sind vorhanden; in der Aufsicht sind die Prismen scharf konturiert.

Champy (Osmiumsäure 2%, $K_2Cr_2O_7$ 3%, Chromsäure 1%, 4 : 7 : 7): Fixationsdauer ½—1 Std. Die Schleifen sind durchweg noch gut erhalten; die hexagonalen Prismen zeigen infolge stärkerer Azidifizierung bei Profilansicht feinnadelige Zerfallsstrukturen.

Ganz allgemein sind die hexagonalen Prismen schwieriger strukturerhaltend zu fixieren als die Schleifen. Der Erhaltungszustand der Einschlußkörper im Tubusteil der Blüte war stets besser als im anthocyanreichen Bezirk und die Kontrolle des Fixationszustandes in den Epidermen leichter durchzuführen als im Mesophyll.

Zur Beurteilung des Einflusses von Wässerung und anschließender Entwässerung auf die Struktur der Einschlußkörper wurden die in der beschriebenen Weise fixierten Präparate weiterbehandelt. Die Zeiten für die Wässerung wechselten von 1 bis 12 Std. Die Alkoholreihe wurde in den Stufen 30%, 50%, 70%, 80% (je 1 Std.) durchlaufen; dann erfolgten die Einbettung der Objekte in Glyzerin und die lichtmikroskopische Kontrolle. Es ergibt sich, daß eine nachträgliche Schädigung der einmal gut fixierten Gewebe im Laufe der Wässerung und in der Alkoholreihe kaum mehr eintritt. Die

Fixation wird damit eindeutig zum wichtigsten Schritt in der mikrotechnischen Verarbeitung virusinfizierter Gewebe. Die Fixation mit 1%- oder 2%iger, gepufferter Osmiumsäurelösung von pH 7,2 wurde für alle elektronenmikroskopischen Objekte durchgeführt. Die 2%ige Osmiumsäurelösung wurde für die Fixation von Blütengeweben deshalb benutzt, weil die zur Kontrolle der Schleifen unumgängliche Wasserinfiltration eine erhebliche Verdünnung des Fixiermittels sowieso bedingt. Im Folgeblattbereich wurde stets mit 1%iger Osmiumsäurelösung fixiert.

Die Kontrastierung mit Uranylacetat nach Strugger (1956): Der Kontrast, den das TMV im elektronenmikroskopischen Präparat selbst nach Osmiumsäurefixation liefert, ist für eine eingehendere Analyse mangelhaft. In den bisher erschienenen elektronenmikroskopischen Arbeiten über virusinfizierte Zellen — soweit mir bekannt — wurden deshalb die ultradünnen Schnitte nach der Auflösung des Einbettungsmittels durch Schrägbedampfung im Kontrast gesteigert und damit das Virus sichtbar gemacht (Black und Mitarb. 1950; Smith 1953; Brandes 1955, 1956; Skotland und Mitarb. 1955; Goldin und Fedotina 1956; Nixon 1956 b). Eine kritische Beurteilung dieser Methode lieferten Frey-Wyssling (1955) und Nixon (1956 a).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Darstellung der Viren in der Zelle erstmalig die von Strugger (1956) eingeführte Kontrastierung mit Uranylacetat angewandt (1%ige Lösung in Aqua dest., Behandlung der Blüten bis zu 4 Std., der Folgeblätter bis zu 2 Std.). Ausreichende Wässerung von mindestens dreimal ½ Std. in Aqua dest. nach der Kontrastierung ist unbedingt nötig.

Die lichtmikroskopische Kontrolle der Objekte nach der Kontrastierung wurde in Stichproben durchgeführt. Der Erhaltungszustand der Schleifen war unverändert. Die Weiterbehandlung der Objekte nach der Kontrastierung erfolgte nach der in der Elektronenmikroskopie üblichen Methode: Alkoholreihe 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% (je ¾—1 Std.), abs. Alkohol dreimal ½ Std.; Gemisch aus Methylmethacrylat und *n*-Butylmethacrylat (1 : 9 Vol.%) in dreimaligem Wechsel je 1—4 Std. (Kühlschrank); Einbettung der Objekte in das mit Katalysator versehene Gemisch in Gelatinekapseln und Polymerisation bei 47° C im Thermostaten über 24 Std. Die Dünnschnitte wurden mit dem Ultramikrotom nach Sjöstrand (Stahlmesser, selten Glaskeil) hergestellt [4]. Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Ultradünnschnitte erfolgte am Elmiskop Ia von Siemens bei 80 kV [4].

Ergebnisse

1. Die Schleifen bestehen im wesentlichen aus fibrillärem Virusmaterial. Es gibt keinen Hinweis auf weitere am Aufbau der Schleifen beteiligte Stoffe.

[4] Für die Herstellung der Ultradünnschnitte danke ich Fräulein Dr. R. Spiekermann, Botanisches Institut der Universität Münster, für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen Fräulein R. Hörig, Elektronenmikroskopische Abteilung der Universität Münster, Leitung Dozent Dr. L. Reimer.

2. In Übereinstimmung mit den lichtmikroskopischen Befunden an nicht fixiertem Material liegt die durchschnittliche Dicke der Schleifen bei 1 μ

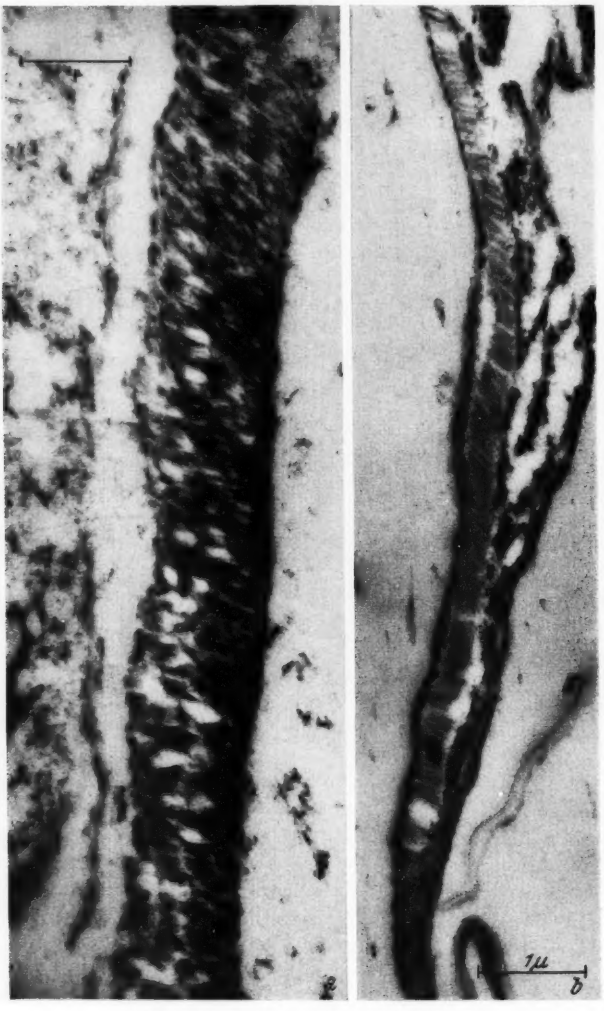


Abb. 16 *a* und *b*. *a* Lichtmikroskopisch sichtbare Schleife aus dem Blütengewebe im Längsschnitt. *b* Sublichtmikroskopische Schleife aus dem Folgeblattbereich, geschlossene cytoplasmatische Umhüllung. (pr. 8800×) 17.600×.

(660—1330 mμ). Eine erhebliche Veränderung infolge Fixation und Entwässerung kann also nicht eingetreten sein. Darüber hinaus wurden Schlei-

fen von 220—400 mμ Dicke sowohl im Blüten- wie im Folgeblattbereich elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht, die eine Erweiterung der lichtmikroskopischen Befunde darstellen (Abb. 16 *b*).

Abb. 17 *a*, *b* und *c*. Schleifen im Längsschnitt. Schnittbänder beweisen den Aufbau aus TMV-Fibrillen. (pr. 15.000×) 30.000×.

3. Die Schleifen besitzen keine Membran; sie werden aber zumindest in Frühstadien von einem Cytoplasmabelag völlig umschlossen (Abb. 16 *b*).

4. Die die Schleife bildenden Virusfibrillen sind schraubig bis korkenzieherartig tordiert. Die Stärke und Richtung der Torsion sind unterschiedlich. Die Torsion kann im Uhrzeigersinn (= rechtsläufig) oder dem Uhrzeigersinn entgegen (= linksläufig) erscheinen. Auf den meisten Präparaten wurden rechtsläufige Schleifen mit einem Fibrillenverlauf von rechts unten nach links oben beobachtet. In jedem Falle liegt eine starke Torsion vor, wie an dem im Vergleich zur Schleifenlängsrichtung schrägen Fibrillenverlauf ersichtlich ist.

Die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Schleifen stützen sich auf die nahezu gleichartige Aussage von 50 elektronenmikroskopischen Aufnahmen aus dem Blütenbereich. Die an Blüten gewonnenen Ergebnisse werden durch gleichartige Befunde an Folgeblättern bestätigt. Auf Grund des guten Fixationszustandes des Cytoplasmas in allen Fällen, in denen es in größerem Umfang getroffen wurde, und durch den unmittelbaren Kontakt von Cytoplasma und Zellwand, der das Fehlen von Schrumpfungen sichert, gewinnen die Aussagen an Zuverlässigkeit.

Diskussion

In Bestätigung früherer Bearbeiter (K l e b a h n 1928 und K a s s a n i s und S h e f f i e l d 1941) und auf Grund eigener Untersuchungen ergibt sich für die unter der Bezeichnung „Fadenbündel" (K l e b a h n 1928) zusammengefaßten fibrillären Einschlußkörper des TMV:

1. Morphologisch sind die Fadenbündel durch ihre normalerweise langgestreckten Formen charakterisiert (Abb. 4). Im Plasmolyseversuch erweisen sich die Fadenbündel als starre, wenig formveränderliche Gebilde.

2. Ihren strukturellen Aufbau aus längsverlaufenden Fibrillen zeigen die Fadenbündel in vielen Fällen von vornherein; ist die Fibrillärstruktur nicht erkennbar, so kann sie leicht durch Azidifizierung verdeutlicht werden. Die Fadenbündel erscheinen infolge unregelmäßiger, schwacher Torsion der Fibrillen häufig inhomogen.

3. Fadenbündel sind in bezug auf den Fibrillenlängsverlauf in allen Fällen eindeutig positiv doppelbrechend.

4. Fadenbündel treten bei verschiedenen TMV-Stämmen in unregelmäßiger Weise auf.

5. In ihrem Verhalten äußeren Einflüssen gegenüber sind die Fadenbündel durch eine erhebliche Stabilität charakterisiert. Bei der Behandlung mit verdünnter Essigsäure (1 : 10) lösen sie sich langsam unter Verdeutlichung der Fibrillärstruktur von den Enden her auf. Eine Umlagerung der Fadenbündel in kristalline Blöckchen durch 1 mol KSCN ist nur in Einzelfällen auszulösen; sie ist dann charakteristisch von der Schleifenumlagerung zu prismatischen Aggregaten verschieden.

Die Schleifen sind demgegenüber in entsprechender Weise zu kennzeichnen:

1. Schleifen weisen normalerweise nur stark gewundene Formen auf. Im Plasmolyseversuch mit schonenden Plasmolytika zeigen Schleifen eine hohe Flexibilität und Elastizität.

2. Über die Struktur der Schleifen lassen sich im Lichtmikroskop kaum Aussagen machen. Im Normalfall sind die Schleifen auf ganzer Länge von gleicher Dicke und völlig homogen. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen den Aufbau der Schleifen aus stark schraubig gewundenen Virusfibrillen.

3. Eine positive Doppelbrechung in bezug auf den Schleifenlängsverlauf wurde in keinem Falle ermittelt.

4. Schleifen wurden ausschließlich und allein bei dem TMV-Gelbstamm G 2 beobachtet, hier aber kontinuierlich während des ganzen Jahres.

5. Schleifen stellen eine sehr instabile Form des TMV dar. Bei der Behandlung mit verdünnter Essigsäure (1 : 10) lösen sich gewundene Schleifen ohne Strukturverdeutlichung von den Enden her auf; jedoch erfolgt dabei eine charakteristische Entspiralisierung. Eine Umlagerung der Schleifen zu prismatischen Aggregaten nach der Behandlung mit 1 mol KSCN läßt sich fast regelmäßig erzielen.

Durch die gegebene Charakterisierung ist eine begründete Abgrenzung der beiden Formenkreise möglich. Die Schleifen erweisen sich als völlig neuer Typ fibrillärer Viruseinschlußkörper.

Zur Struktur der hexagonalen Prismen

Seit den ersten Untersuchungen an tabakmosaikvirusinfizierten Pflanzen (Iwanowski 1903) sind Zelleinschlußkörper bekannt, die in Aufsicht eine im typischen Fall sechseckige, im Profil eine rechteckige Umrißform aufweisen und die als hexagonale Prismen oder Platten (im Folgenden: h. P.) bekannt sind. Durch eingehendere Untersuchungen von Goldstein (1924, 1926) und Sheffield (1931, 1934) u. a. sind unsere Kenntnisse über Entwicklungsgeschichte und Morphologie, Vorkommen und Bildungsbedingungen der h. P. erweitert und im wesentlichen abgeschlossen worden. Zusammenfassende Darstellung und Literaturangaben bei Bawden (1950) und Köhler und Klinkowski (1954).

Über die Struktur wurden nur knappe Angaben gemacht, unter denen der nadelige Zerfall nach Azidifizierung (Iwanowski 1903; Goldstein 1926; Sorokin 1927) und die Doppelbrechung bei Profilansicht besonders erwähnenswert sind. Erst in neuerer Zeit beschäftigten sich Wilkins und Mitarb. (1950) in einer vornehmlich polarisationsmikroskopischen Studie mit der Struktur der h. P. etwas eingehender. Durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen von isoliertem Prismenmaterial durch Steere und Williams (1953) wurde der Aufbau der h. P. aus TMV-Partikeln erwiesen, der schon auf Grund von lichtmikroskopischen Untersuchungen von Purdy-Beale (1937) vermutet worden war. Einen sehr wesentlichen Fortschritt stellt die Arbeit von Brandes (1956) dar, der in der Zelle den Aufbau der h. P. aus fibrillärem TMV-Material am Ultradünnschnitt nach Schrägbedampfung unmittelbar zeigen konnte. Weniger eindeutig sind dagegen die nach Fixation mit Trichloressigsäure erhaltenen Ergebnisse von Goldin und Fedotina (1956). Ziel der eigenen Untersuchungen mußte es sein, die bestehenden Unstimmigkeiten zwischen polarisationsmikroskopisch und elektronenmikroskopisch ermitteltem Strukturbild zu klären.

Lichtmikroskopische Strukturanalyse

Für die Strukturanalyse kommen nur völlig ungeschädigte Zellen in Frage. Aufsichtsbilder der h. P. zeigen normalerweise keine Strukturen und sind völlig homogen (Abb. 18 *a*). Ganz selten, verdeutlicht bei Schräglage, ist eine Schichtstufe festzustellen (Abb. 18 *b*).

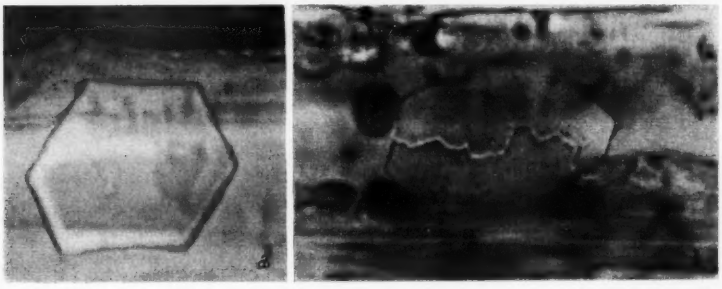


Abb. 18 *a* und *b*. *a* Hexagonales Prisma im Rindenparenchym der Wurzel in Aufsicht. Vergr. 800×. *b* h. P. im Rindenparenchym des Sprosses. Die Schräglage verdeutlicht eine Schichtstufe. Vergr. 1660×.

In Profilbildern ist diese Schichtung senkrecht zur hexagonalen Achse unter bestimmten Bedingungen ebenfalls lichtmikroskopisch erkennbar, z. B.

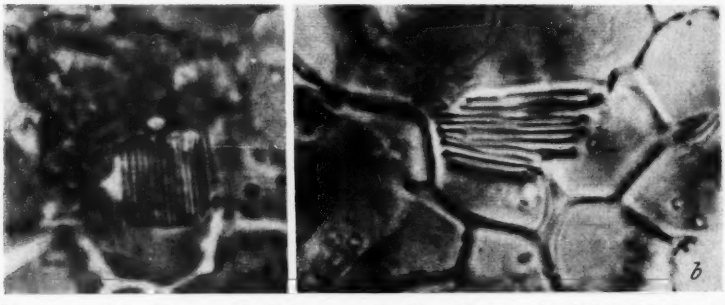


Abb. 19 *a* und *b*. Hexagonale Prismen in Profilansicht mit deutlicher Schichtstruktur. Vergr. *a* 2080×, *b* 1750×.

in den phellogennahen Zellen des Phellems, im Rindenparenchym, in Blatt- und Blütengeweben. Die Sichtbarkeit der Einzelschichten erfolgt im Zuge einer Lockerung des Zusammenhaltes der Schichten untereinander; dabei kommen graduelle Unterschiede vor. Während normalerweise die ursprünglich rechteckige Umrißform der h. P. in Profilansicht erhalten bleibt (Abb. 19 a), kommt es besonders im Blütenbereich oft zu einer Verschiebung und einem Auseinandergleiten der Schichtstöße senkrecht zur hexagonalen Achse; es entstehen unregelmäßige Profilbilder, die die Eigenständigkeit der Einzelschichten verdeutlichen (Abb. 19 *b*).

An Prismen aus verschiedenen Geweben wurden Schichtdicken bestimmt. Bei insgesamt 45 untersuchten Prismen ergab sich in völliger Übereinstimmung mit den Befunden von Wilkins und Mitarb. (1950) eine Minimalschichtdicke von 0,3 μ, die mit der Partikellänge des TMV gut übereinstimmt (Abb. 19 *a*). Häufig wurde auch die doppelte Schichtdicke mit 0,55—0,6 μ aufgefunden (Abb. 19 *b*).

Angesichts der erwiesenen Schichtstruktur für einzelne Prismen und der vermuteten Schichtstruktur aller h. P. war es naheliegend, die von Strugger (1947, 1951) so erfolgreich bei der Strukturanalyse lamellärer Körper benutzten Quellungsmittel anzuwenden.

Quellung mit 0,8 mol KOH: Die Quellungsversuche konnten nicht an fixiertem Material unternommen werden, da die Fixation auch mit den besten Fixiermitteln nachweislich zu Veränderungen der Prismenstruktur führen kann. Die Anwendung der KOH selbst für die Strukturanalyse ist nicht unbedenklich, da durch Schramm und Mitarb. (1955) der Zerfall des TMV in alkalischer Lösung und durch eigene Untersuchungen zum Formwechsel die Umlagerungsfähigkeit des TMV bekannt sind. Konzentration und Einwirkungsdauer spielen dabei jedoch eine ausschlaggebende Rolle. Die Schnelligkeit, mit der unabhängig von der Größe und Ausbildungsform alle Prismen ohne Ausnahme aufblättern und eine Schichtstruktur zeigen, und die hohe Ordnung der Schichtung, die dabei in allen Fällen sichtbar wurde, unterstützen die Annahme einer primär gegebenen Schichtstruktur. An Blütenmaterial mit stellenweise massenhaftem Vorkommen von h. P. und der Möglichkeit, am Farbumschlag des Anthocyans den Weg der KOH zu verfolgen, wurde bevorzugt gearbeitet. Die Beobachtung der Aufblätterung ist nur an Profilansichten möglich. Im allgemeinen erfolgt die Quellung mit der Kalilauge außerordentlich rasch, da das Eindringungsvermögen in die Zellen sehr groß ist.

Quellung mit 0,6—1 m KSCN: Die Quellung mit KSCN hat gegenüber der mit KOH den Vorteil, daß sie erheblich langsamer verläuft und nicht bis zur totalen Aufblätterung mit rascher Auflösung der Schichten führt. Auch liegt der pH einer 1 mol KSCN-Lösung unter dem einer 1 mol KOH-Lösung, und da nach Schramm und Mitarb. (1955) die Spaltung des TMV überhaupt erst bei pH 9,2 nach 36stündiger Dialyse bei $+4^0$ C elektrophoretisch nachweisbar wird, so entfällt die Kritik eines sekundären Zerfalls der Prismen in partikelhaltige Schichten. Im übrigen entsprechen die mit KSCN erhaltenen Strukturbilder der h. P. völlig denen nach Quellung mit KOH.

Elektronenmikroskopische Strukturanalyse

Bereits im Abschnitt über die Struktur der Schleifen sind die Ergebnisse der mit den verschiedensten Fixiermitteln an Blütenblättern durchgeführten Fixationsversuche dargestellt. Die als gestreifte Massen (= striate material) in der Literatur immer wieder beschriebenen Strukturbilder der h. P. sind Fixationsartefakte essigsäurehaltiger Fixiermittel (Goldstein 1926, Hoggan 1927 u. a.). Die Anwendung von 1%- oder 2%iger, gepufferter

Osmiumsäurelösung erwies sich — wenn auch nicht in allen Fällen (vergl. Brandes 1956) — für eine Strukturerhaltung als brauchbar. Unterschiede im Erhaltungszustand der h. P. sind angesichts der unterschiedlichen Bedingungen in den einzelnen Geweben und bei dem unkontrollierbaren Einfluß der Zellsaftazidität von vornherein zu erwarten.

Die Behandlung der Objekte bis zur elektronenmikroskopischen Beobachtung erfolgte hier wie in der für die Strukturuntersuchung der Schleifen bereits angegebenen Weise.

Ergebnisse

Es kamen ausschließlich Profilbilder der h. P. zur Beobachtung.

Die hexagonalen Prismen bestehen im wesentlichen aus Virusmaterial. Es gibt keinen Hinweis auf weitere am Prismenaufbau beteiligte Stoffe.

Eine eigentliche Prismenmembran existiert nicht. Es kommt jedoch eine unterschiedlich starke Umhüllung durch das Cytoplasma vor. Ist der Cytoplasmaschlauch dünn, so wird zum Teil eine Membran vorgetäuscht (Abb. 20).

Als ursprüngliche Prismenstruktur wird in Übereinstimmung mit den licht- und polarisationsmikroskopischen Befunden die Schichtstruktur senkrecht zur hexagonalen Achse angesehen. Die Einzelschicht wird dabei von TMV-Partikeln von ungefähr 300 mμ Länge in dichter Parallelordnung aufgebaut. Eine charakteristische, von Schicht zu Schicht wechselnde Schräglage der Partikeln im Vergleich zur Richtung der hexagonalen Achse wurde nicht oder nur lokal beobachtet. Prismen mit zwei und drei Schichten waren die jüngsten, elektronenmikroskopisch erfaßten Frühstadien der Prismenbildung in Sekundärblättern keimlingsinfizierter Tabakpflanzen 26 Tage p. i. (= post infectionem).

Die für das TMV charakteristische Partikeldicke von 15 mμ ist zum Teil bestimmbar. Der Abstand der gefärbten Fäden in Abb. 21 beträgt an geordneten Stellen 15—20 mμ. Ob es sich dabei um einen mit Uranylacetat angefärbten Nukleinsäuredocht (Schramm und Mitarb. 1955) oder um einen sekundär erfüllten Hohlkanal (Huxley 1956 und Fernández-Morán und Schramm 1958) handelt, bleibt zunächst unentschieden. Alle längsfibrillär strukturierten Prismen (Abb. 20) werden als Fixationsartefakte gedeutet, die durch Längsaggregation der Viruspartikeln bei unzulänglicher Fixation unter Erhaltung der äußeren Umrißform entstehen.

Diskussion

Nach Abschluß der vorliegenden Arbeit wurde die Veröffentlichung von Steere (1957) bekannt, in der auf Grund einer elektronenmikroskopischen Untersuchung ebenfalls die Schichtstruktur der h. P. publiziert wird. Die auf methodisch völlig andersartigem Wege gewonnen Präparate (Gefrierfixation, Schrägbedampfung, Kohlefilmreplica-Verfahren) stellen eine erfreuliche Bestätigung der eigenen Befunde dar (vergl. Wehrmeyer 1957). Somit ist die Schichtstruktur licht-, polarisationsmikroskopisch und elektronenmikroskopisch in gleicher Weise bestätigt. In bezug auf die Partikelorientierung innerhalb der Einzelschichten wurde jedoch von Steere nur

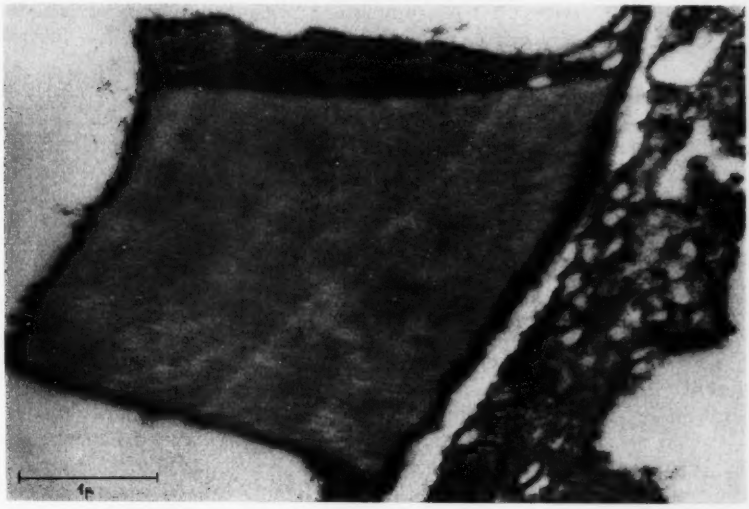


Abb. 20. Geschlossene Cytoplasmaumhüllung eines Prismas (Profilansicht). (pr. 13.000×) 22.500×.

Abb. 21. Profilansicht eines hexagonalen Prismas mit ausgebildeter Schichtstruktur. Einzelschicht aus längsseits parallelgeordneten TMV-Partikeln von 300 mμ Länge: der Abstand der gefärbten „Fäden" an geordneten Stellen 15—20 mμ. (pr. 21.500×) 48.000×.

einmal die aufgezeigte Parallelordnung der Viruspartikel zur hexagonalen Achse, mehrfach dagegen eine von Schicht zu Schicht wechselnde, geringe Schräglage gefunden: Fischgrätmuster (= herringbone pattern). Steere glaubt (l. c., Seite 33): „It is probable that both types of crystal are formed in nature." Auch in der bereits zitierten Arbeit von Wilkins und Mitarb. (1950) werden zwei Kristalltypen diskutiert, die den beiden aufgefundenen Strukturtypen entsprechen dürften.

Zusammenfassung

1. Mit den Schleifen wird eine neue Form fibrillärer Einschlußkörper des TMV aufgefunden, die sich von den übrigen fibrillären Einschlußkörpern (= Fadenbündel nach Klebahn 1928) charakteristisch unterscheidet.

Die Schleifen finden daher in der vorliegenden Veröffentlichung eine eingehende Darstellung, die Vorkommen, Morphologie, Entwicklungsgeschichte, Formwechsel und Struktur der Schleifen umfaßt.

2. Die Struktur der seit Iwanowski (1903) bekannten hexagonalen Prismen wird licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. In Übereinstimmung mit den polarisationsmikroskopischen Befunden von Wilkins und Mitarb. (1950) und in Bestätigung der erst nachträglich bekannt gewordenen elektronenmikroskopischen Befunde von Steere (1957) (vergl. Wehrmeyer 1957) wird der Nachweis einer Schichtstruktur für die hexagonalen Prismen erbracht. Die Einzelschichten verlaufen senkrecht zur hexagonalen Achse und bestehen aus TMV-Partikeln von 300 mμ Länge in dichter Parallelordnung.

Literatur

Amelunxen, F., 1956: Über die Strukturanalyse der Eiweißspindeln der *Cactaceae*. Protoplasma *45*, 228.

— 1957: Die Virus-Eiweißspindeln der Kakteen. Dissertation, Münster.

Avery, G. S., 1933 a: Structure and germination of tobacco seed and developmental anatomy of the seedling plant. Amer. J. Bot. *20*, 309.

— 1933 b: Structure and development of tobacco leaf. Amer. J. Bot. *20*, 565.

Bald, J. G., 1948: The development of amoeboid inclusion bodies of tobacco mosaic virus. Austral. J. Sci. Res. Ser. B *1*, 458.

— 1949: Additional methods for fixing and staining viruses in infected plant tissues. Amer. J. Bot. *36*, 335.

Bancher, E., 1953: Die *Paeonia*-Blüte und ihr zellphysiologisches Verhalten während des Abblühens. Protoplasma *42*, 482.

Bawden, F. C., 1950: Plant viruses and virus diseases. Chronica Botanica Co., Waltham, Mass. 3. Aufl.

— and N. W. Pirie, 1946: The virus content of plants suffering from tobacco mosaic. Brit. J. Exp. Path. *27*, 81.

Black, L. M., C. Morgan and R. W. G. Wyckoff, 1950: Visualisation of tobacco mosaic virus within infected cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *73*, 119.

Brandes, J., 1955: Elektronenmikroskopischer Nachweis von Pflanzenviren in ihren Wirtszellen. Naturwiss. *42*, 101.

— 1956: Über das Aussehen und die Verteilung des Tabakmosaikvirus im Blattgewebe. Phytopath. Z. *26*, 93.

Fernández-Morán, H., and G. Schramm, 1958: The structure of TMV as revealed in ultrathin sections by electron microscopy. Z. Naturforsch. *13 b*, 68.

Frey-Wyssling, A., 1955: Die submikroskopische Struktur des Cytoplasmas. Protoplasmatologia *II*, A, 2. Springer-Verlag, Wien.

Goldin, M. I., and V. L. Fedotina, 1956: Mosaic virus of tobacco, studied by the method of ultra-thin sections (russ.). Dokl. Akad. Nauk SSSR. *111*, 1115.

Goldstein, B., 1924: Cytological study of living cells of tobacco plants affected with mosaic disease. Bull. Torrey Bot. Club *51*, 261.

— 1926: A cytological study of the leaves and growing points of healthy and mosaic diseased tobacco plants. Bull. Torrey Bot. Club *53*, 499.

Hoggan, I. A., 1927: Cytological studies on virus diseases of Solanaceous plants. J. Agric. Res. *35*, 651.

Huxley, H. E., 1956: Some observations on the structure of tobacco mosaic virus. In: Proc. Stockholm Conference 1956, 260.

Iwanowski, D., 1903: Über die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze. Z. Pflanzenkrankh. *13*, 1.

Kassanis, B., and F. M. L. Sheffield, 1941: Variations in the cytoplasmic inclusions by three strains of tobacco mosaic virus. Ann. Appl. Biol. *28*, 360.

Klebahn, H., 1928: Experimentelle und cytologische Untersuchungen im Anschluß an Alloiophyllie und Viruskrankheiten. Planta *6*, 40.

Köhler, E., 1942: Die Überempfindlichkeitsreaktion bei *Solanum nodiflorum* Jacq. gegenüber Stämmen des Tabakmosaik- und Kartoffel-X-Virus. Z. Pflanzenkrankh. *52*, 450.

— und M. Klinkowski, 1954: Viruskrankheiten. Sorauers Hdbuch der Pflanzenkrankh. *II*, 1. 6. Aufl.

Limasset, P., et P. Cornuet, 1950: Etude de la corrélation entre l'age des organes aériens et la quantité de virus contenue dans ces derniers chez le tabac infecté par le virus de la mosaïque du tabac. Ann. Inst. Nat. Rech. Agron. Sér. C *1*, 274.

Littau, V. C., and L. M. Black, 1952: Spherical inclusions in plant tumors caused by a virus. Amer. J. Bot. *39*, 87.

Melchers, G., und G. Schramm, 1940: Über den Verlauf der Viruskrankheit in anfälligen und resistenten Rassen von *Nicotiana tabacum*. Naturwiss. *28*, 476.

Nixon, H. L., 1956 a: Electron Microscopy. Rothamsted Experimental Station. Zit.: Biochem. J. *63*, 34 p.

— 1956 b: An estimate of the number of tobacco mosaic virus particles in a single hair cell. Virology (New York) *2*, 126.

Purdy-Beale, H. A., 1937: Relation of Stanley's crystalline tobacco-virus protein to intracellular crystalline deposits. Contrib. Boyce Thompson Inst. Plant Res. *8*, 414.

Raaz, F., und H. Tertsch, 1939: Geometrische Kristallographie und Kristalloptik. Springer-Verlag, Wien.

Rinne, F., und M. Berek, 1953: Anleitung zu optischen Untersuchungen mit dem Polarisationsmikroskop. 2. Aufl. Stuttgart 1953.

Romeis, B., 1948: Mikroskopische Technik. 15. Aufl. Leibniz Verlag, München.

Rubio-Huertos, M., 1954: Extracción observación al microscopio electrónico de las inclusiones intracelulares cristalinas producidas par el virus „Mosaico del tobaco". Microbiol. espan. *7*, 97.

— 1956: Origin and composition of cell inclusions associated with certain tobacco and crucifer viruses. Phytopathology *46*, 333.

Schramm, G., 1954: Die Biochemie der Viren. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg.

Schramm, G. Schumacher und W. Zillig, 1955: Über die Struktur des Tabakmosaikvirus III. Der Zerfall in alkalischer Lösung. Z. Naturforsch. *10 b*, 481.

Sheffield, F. M. L., 1931: The formation of intracellular inclusions in Solanaceous hosts infected with aucuba mosaic of tomato. Ann. Appl. Biol. *18*, 471.

— 1934: Experiments bearing on the nature of intracellular inclusions in plant virus diseases. Ann. Appl. Biol. *21*, 430.

Skotland, C., D. Hagedorn, and M. A. Stahmann, 1955: Electron microscopy of tobacco mosaic virus in situ. Phytopathology *45*, 603.

Smith, J. Henderson, 1930: Intracellullar inclusions in mosaic of *Solanum nodiflorum*. Ann. Appl. Biol. *17*, 213.

Smith, K. M., 1955: A note on the observation of viruses in the cells of infected plants. Biochim. Biophys. Acta (Amsterdam) *10*, 210.

Sorokin, H., 1927: Phenomena associated with the destruction of the chloroplasts in tomato mosaic. Phytopathology *17*, 363.

Steere, R. L., 1957: Electron microscopy of structural detail in frozen biological specimens. J. Biophys. Biochem. Cytology *3*, 45.

— and R. C. Williams, 1953: Identification of crystalline inclusion bodies extracted intact from plant cells infected with tobacco mosaic virus. Amer. J. Bot. *40*, 81.

Strugger, S., 1932: Über Plasmolyse mit Kaliumrhodanid. Ber. dtsch. bot. Ges. *50*, 24.

— 1947: Die Anwendung des Phasenkontrast-Verfahrens zum Studium der Pflanzenzelle. Z. Naturforsch. *2 b*, 146.

— 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg.

— 1951: Die Strukturordnung im Chloroplasten. Ber. dtsch. bot. Ges. *64*, 69.

— 1956: Die Uranylacetat-Kontrastierung für die elektronenmikroskopische Untersuchung von Pflanzenzellen. Naturwiss. *43*, 357.

Weber, F., und G. Kenda, 1952: Die Viruskörper von *Opuntia subulata*. Protoplasma *41*, 378.

Wehrmeyer, W., 1957: Darstellung und Strukturordnung eines Tabakmosaikvirus-Einschlußkörpers in der Zelle. Naturwiss. *44*, 519.

Wilkins, M. H. F., A. R. Stokes, W. E. Seeds, and G. Oster, 1950: Tobacco mosaic virus crystals and three dimensional microscopic vision. Nature (London) *166*, 127.

Aus dem Institut für Kinematische Zellforschung der Universität Frankfurt a. Main
(Direktor: Professor Dr. W. K u h l)

Bewegungsphysiologische Untersuchungen an polycystiden Gregarinen unter Anwendung des Mikrozeitrafferfilmes[1]

Von

Ingo-Ernst Richter

Mit 43 Abbildungen

(Eingegangen am 23. August 1958)

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung 198
II. Material und Methode 199
III. Subjektive Beobachtungen 201
1. Die „passive" Gleitbewegung 201
2. Die „aktive" Bewegung 204
3. Die Cystenbildung 207
IV. Teilbildanalyse der Bewegungsvorgänge 210
1. Die Gleitbewegung 210
2. Bewegungsphysiologisches Verhalten in saurem und alkalischem Medium 213
V. Untersuchungen an festgelegten Tieren 219
1. Zur Frage der Protoplasmaströmung 219
2. Die Strömung an der Gregarine 220
VI. Unter Zeitraffung sichtbare Kontraktionen während der Gleitbewegung 223
VII. Zur Reizphysiologie der Gregarinen 226
1. Einfluß der Temperatur 227
2. Lichtreiz 228
3. Chemischer Reiz 228
4. Mechanischer Reiz 232
VIII. Zur Theorie der Bewegung polycystider Gregarinen 234
IX. Zusammenfassung der Ergebnisse 238
Literatur 239

[1] Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. W. K u h l, danke ich für die Überlassung des Thema, für seinen ständigen Rat und seine Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit. — Auch Frau G. K u h l schulde ich Dank für ihre wertvollen Hinweise.

I. Einleitung

Die vor einigen Jahren von E. Moser (1946) an Monocystideen durchgeführten bewegungsphysiologischen Untersuchungen gaben die Anregung, das Problem der Bewegung, insbesondere der „ohne sichtbare Kontraktion der Leibeshülle fortschreitenden Bewegung" (Kölliker 1847) an polycystiden Gregarinen wieder aufzunehmen. Wichtige Arbeiten auf diesem Gebiet liegen schon lange Zeit zurück, so daß es ratsam erscheint, einen kurzen Überblick zu geben.

In den Jahren 1893—1894 beschrieb Schewiakoff die Gleitbewegung der Gregarinen und stellte die Theorie auf, die auch heute noch in jedem Lehrbuch zu finden ist: Die Gregarine scheide eine gallertige, klebrige Substanz ab, die sich an der Unterlage anhefte; durch weiteres Abscheiden verlängere sich der „Stiel", an dessen Spitze das Tier vorwärts geschoben werde. Crawley (1902) hält dagegen winzige Myonemkontraktionen für die Ursache der Bewegung. Er steht mit dieser Ansicht nicht allein, denn 1897 sind schon Porter und Bütschli zu ähnlichen Ansichten gekommen. Die Arbeiten Sokolows (1912) knüpfen an die Schewiakoffsche Theorie an; jedoch sieht er in dem Vorgang des Gallerteabscheidens die Bewegungsursache. Er konnte zeigen, daß sich hinter dem Tier kein sich verlängernder Stiel bildet, sondern zum Beispiel in Tuschepräparaten feine Partikelchen nachgeschleppt werden. Zur Stützung seiner Theorie führt Sokolow auch seine Untersuchungen in sauren Medien an. Die Tiere „krümmen" sich fast auf der Stelle, als Folge der in saurem Milieu nicht möglichen Schleimabgabe. Prell (1921) modifiziert diese Theorie: Er hält nicht den Vorgang des Sezernierens für den entscheidenden Faktor der Bewegung, sondern den Quellungsdruck, den die schon abgeschiedene gallertige Substanz auf das Tier ausübt. Somit dürfte nach Prell die Gleitbewegung physikalisch wesentlich besser zu erklären sein. Aber die Frage, ob aus mikroskopisch unsichtbaren Poren eine visköse Substanz überhaupt abgeschieden werden kann, mußten sowohl Sokolow als auch Prell unbeantwortet lassen.

Neben der „passiven" Gleitbewegung wird der „aktiven" Bewegung nur wenig Beachtung in der Literatur geschenkt. Mühl (1921) teilt die Bewegung der Gregarinen in drei Gruppen ein: 1. Peristaltische Bewegung, ähnlich der von *Monocystis agilis* Stein. 2. Energische Knickbewegung durch Kontraktion ringförmiger, selten längsverlaufender Myoneme und 3. Passive Bewegung. Ebenso unterscheidet Prell (1921) in seiner Arbeit eine „peristaltische Bewegung und Krümmungsbewegung durch Kontraktion des Protoplasten oder seiner Myoneme" und eine „gleitende Bewegung ohne Gestaltsveränderung".

Nach den bis heute vorliegenden Arbeiten lassen sich also verschiedene Bewegungsarten für polycystide Gregarinen unterscheiden: 1. Die passive oder gleitende Bewegung, die ohne Änderung der Gestalt des Tieres und ohne sichtbare Tätigkeit irgendwelcher Organellen abläuft. 2. Die aktive Bewegung, bei der sich die Tiere mit Hilfe von Myonemkontraktionen unter lebhaften Gestaltsänderungen fortbewegen. 3. Es werden „Knickungen" und

„peristaltische" Bewegungen beschrieben, deren Bedeutung für die Ortsveränderung unklar bleibt.

In den oben genannten Arbeiten werden die Ausdrücke „Schleim" und „Gallerte" offensichtlich zur Bezeichnung ein- und derselben Substanz verwandt.

Die zahlreichen bisherigen Untersuchungen über die Bewegung der Gregarinen zeigen, daß nur durch die Anwendung einer neuen Untersuchungsmethode weitere Ergebnisse zu erwarten sind. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode der Kinematographie angewandt. Nur mit Hilfe des Filmes ist es möglich, die Bewegung einer größeren Zahl von Tieren gleichzeitig zu beobachten und meßbare Größen zu erarbeiten.

Es sollen hier nur einige Fragestellungen aufgezeigt werden, die sich aus der schon zitierten Literatur ergeben:

Sokolow (1912) stellte in seinen Untersuchungen mit sauren Medien fest, daß keine Gleitbewegung mehr stattfindet, sondern durch die „aktive" Bewegung ersetzt wird. Der Autor folgerte aus diesen Beobachtungen, daß im sauren Medium kein Schleim mehr abgeschieden werden könne. Diese Arbeit regte eigene pH-Untersuchungen an. Es war dabei von Interesse, wie sich die Tiere beim Übergang von der „passiven" zur „aktiven" Bewegung verhalten. Nach Angaben anderer Autoren tritt die „aktive" Bewegung nicht nur in sauren Medien auf. Die Frage, wann die Gleitbewegung durch die „aktive" Bewegung ersetzt wird, ist also durch die Sokolowschen Versuche noch nicht erschöpfend beantwortet.

Bei der Bewegung der Protozoen spielt die Protoplasmaströmung eine bedeutende Rolle. Es war daher zu prüfen, ob für die Entstehung der Gleitbewegung Strömungen des Protoplasma als Ursache in Frage kommen.

Ganz besonders aber war zu erwarten, daß die Anwendung des Zeitrafferfilmes und die sorgfältige Auswertung — Teilbildanalyse (Kuhl 1937) — zu neuen Erkenntnissen der Gregarinenbewegung führen, zu denen wir auf Grund unseres angeborenen Zeitmomentes durch alleinige subjektive Beobachtung nicht gelangen können.

II. Material und Methode

Zur Untersuchung gelangten die drei im Darm der Larve des Mehlkäfers (*Tenebrio molitor* L.) lebenden Arten: *Gregarina cuneata* Stein, *Gregarina polymorpha* Hammerschmidt und die seltener auftretende *Gregarina steini* Berndt.

Die mit Gregarinen befallenen Därme der *Tenebrio*-Larven wurden in Salznäpfchen zerzupft. Als Untersuchungsflüssigkeit erwies sich eine 0,8%ige NaCl-Lösung relativ am günstigsten; sichtbare Schädigungen traten erst nach mehr als 14 Stunden ein. Da die Materialbeschaffung keine Schwierigkeiten bot, war es möglich, die Beobachtung eines Präparates auf wenige Stunden zu beschränken. Die normalen Lebensbedingungen dieser Tiere als Darmparasiten machen es sehr wahrscheinlich, daß Sauerstoffzutritt eher schädigend als förderlich ist; deshalb wurden die Präparate, soweit der betreffende Versuch es zuließ, sofort all-

seitig mit Paraffin umrandet. Ein Einfluß der Lichtquelle kann für die kurze Zeit der Beobachtung und Filmaufnahme verneint werden; es wurde immer ein starkes Grünfilter (VG 3 Schott) benutzt. Eine Wärmeschädigung durch die Niedervoltlampe (Monla) ist nie eingetreten, wie Temperaturversuche ergaben.

Die Mehrzahl der Filmaufnahmen wurde mit der automatischen Mikrofilmkamera der Firma Zeiss-Winkel durchgeführt. Leider erlaubte die relativ schnelle Bewegung der Gregarinen keine stärkere Zeitraffung; es wurde fast ausschließlich eine Raffung auf $^1/_{16}$, d. h. 1 Bild/Sekunde angewandt.

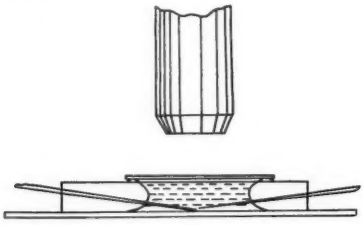


Abb. 1.

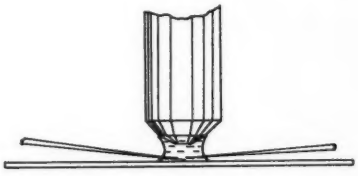


Abb. 2.

Abb. 1. Anordnung zur Beobachtung der festgelegten Gregarinen in der Kammer.
Abb. 2. Eintauchobjektiv (E. Leitz) an Stelle der Kammer.

Zu den Untersuchungen der Abhängigkeit der Bewegung vom pH-Wert des Mediums ist folgendes zu bemerken:

Die mit Phosphat-Puffer nach Sörrensen abgepufferte Kochsalzlösung wurde mit verschiedenen Säuren und Laugen angesäuert bzw. alkalisch gemacht. Der pH-Wert wurde dann mit Hilfe eines elektrischen pH-Meters (Metrom) festgestellt (Genauigkeit $\pm$ 0,05).

Ein mit Parasiten reichlich angefüllter Darm wurde mit einer Pipette angestochen und die mit dem Darminhalt aufgenommenen Gregarinen sofort in die entsprechende Lösung gegeben. Zu gleicher Zeit wurde jeweils ein Kontrollpräparat angefertigt. Auf diese Weise konnte eine Versuchsreihe mit dem Inhalt eines Darmes durchgeführt werden.

Sowohl zur Klärung der Frage einer Protoplasmabewegung in Gregarinen wie auch zur Beobachtung einer Strömung am Tier entlang, war es notwendig, die Gregarinen derart festzulegen, daß sie sich nicht mehr bewegen konnten, jedoch durften sie nicht durch Druck geschädigt werden. Zu diesen Versuchen wurde der Mikromanipulator von E. Leitz benutzt. Geeignete Syzygien wurden mit zwei langausgezogenen Glaskapillaren, die dadurch federnd auf die Tiere drückten, festgehalten. Die Beobachtungen erfolgten entweder in einer 2 mm hohen Kammer, in der ein großer Tropfen gegen das Deckglas ansprang, derart, daß sich im Schnitt gesehen eine große bikonkave Flüssigkeitsschicht ergab, in deren Mittelpunkt das Objekt lag, oder es wurde mit einem Eintauchobjektiv gearbeitet (Abb. 1 und 2). Strömung in Objektnähe durch Verdunstung wurde dadurch vermieden. Die Aufnahmen zu diesen Versuchen erfolgten mit

einem über dem Mikroskop des Mikromanipulator angebrachten Universal-Kinamo (35-mm-Normalfilm) unter einer Zeitraffung auf 1/48.

III. Subjektive Beobachtungen

1. Die „passive" Gleitbewegung

Vergleicht man die in der Einleitung aufgezeigten vier Hypothesen, so ergibt sich, daß sich drei auf einen gemeinsamen Faktor stützen. Sie bringen die gleitende Fortbewegung der Gregarinen mit dem Abscheiden einer gallertigen Substanz in Verbindung. Es stand daher die Frage nach dem Verhalten dieser Gallerte im Vordergrund.

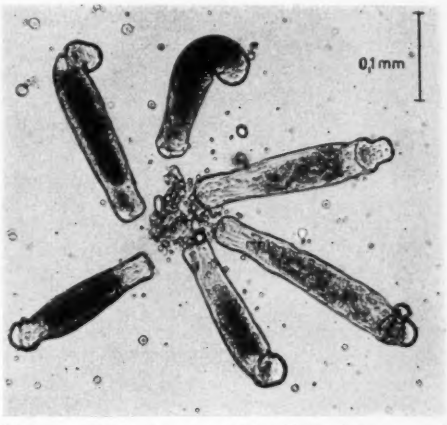


Abb. 3. *Gregarina* sp. Sechs Tiere hängen mit dem Hinterende an einem aus dem Darm des Wirtstieres stammenden Schleimpfropfen. Bewegungsversuche scheitern, dabei knicken die Tiere kurz hinter dem Protomeriten abwechselnd nach links und rechts um.

Die Mehrzahl der in einem Präparat sich bewegenden Gregarinen schleppt eine verschieden große Ansammlung einer viskösen Substanz am Hinterende mit. Noch deutlicher zeigten das Tusche- oder Karminpräparate. Den Schewiakoffschen Gallertstiel vorzufinden, wird niemand mehr erwarten. Was man aber in einem solchen Präparat vorfinden muß — sofern die Theorien von Sokolow (1912) und Prell (1921) für die Bewegung der Gregarinen zutreffen sollten — ist entweder eine Volumzunahme der nachgeschleppten Gallerte, oder das Austreten einer Substanz aus dem Körper des Tieres muß durch eine Verdrängung von zugesetzten Tuschepartikelchen sichtbar werden. Es ist dabei gleichgültig, ob man den Vorgang der Gallerteabscheidung oder das Quellen des bereits sezernierten Schleimes als Ursache der Bewegung annimmt. Es zeigte sich jedoch in der Umgebung der Tiere keine Ortsverlagerung der Fremdpartikel mit Ausnahme derjenigen Teilchen, die nahezu unter den Tieren lagen.

Die geschilderten Beobachtungen ließen bereits starke Zweifel an der Richtigkeit der „Gallertetheorien" aufkommen. In diesem Zusammenhang verdient eine weitere Beobachtung Aufmerksamkeit: In einem Präparat hingen mehrere Gregarinen mit dem Hinterende an einer Ansammlung von Schleim fest, und zwar jede nach einer anderen Richtung. Abwechselnd versuchten die Tiere, ihren Weg fortzusetzen und schleppten den Schleim mit den anhängenden Artgenossen ein Stück mit, bis andere mit dem Ziehen

anfingen. Häufig krümmten sich die Tiere dabei kurz hinter dem Protomeriten ein (Abb. 3). Sowohl nach der Theorie von Sokolow (1912) als auch

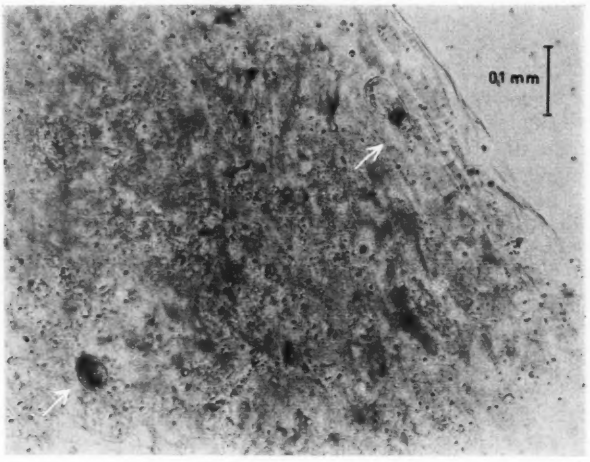


Abb. 4. Der nahezu parasitenfreie Darm einer *Tenebrio-Larve* unterscheidet sich in bezug auf die Schleimmenge nicht vom Darminhalt stark befallener Larven.

nach der von Prell (1921) hätte es den Tieren möglich sein müssen, sich, wenn auch nicht von dem sichtbaren Schleimballen abzulösen, so doch zu-

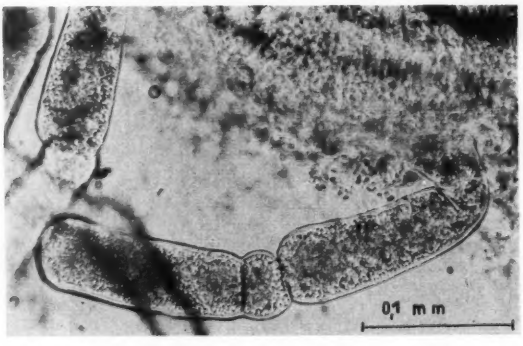


Abb. 5. *Gregarina cuneata.* Eine am Darmepithel des Wirtstieres festsitzende Syzygie bewegt sich durch lokal begrenzte Kontraktion seitlicher Myoneme kurz hinter der Grenze Protomerit-Deutomerit hin und her.

mindest voneinander zu entfernen. Der Abstand zwischen den Gregarinen blieb aber, abgesehen von kleinen Abweichungen, die durch die Elastizität des Schleimes hervorgerufen wurden, konstant.

In der Schleimmasse eingeschlossen fanden sich immer zahlreiche Reste

pflanzlicher Zellen. Diese Tatsache, wie auch die Beobachtung, daß keine Zunahme des Schleimes durch Absonderung stattfindet, und daß der Darminhalt parasitenfreier Larven sich von dem mit Gregarinen infizierter Därme nicht unterscheidet, erlaubt wohl den Schluß, daß der Schleim, der von diesen Tieren immer wieder mitgeschleppt wird, ein Produkt des Wirtstieres ist und mit der Bewegung der Gregarinen nichts zu tun hat (Abb. 4).

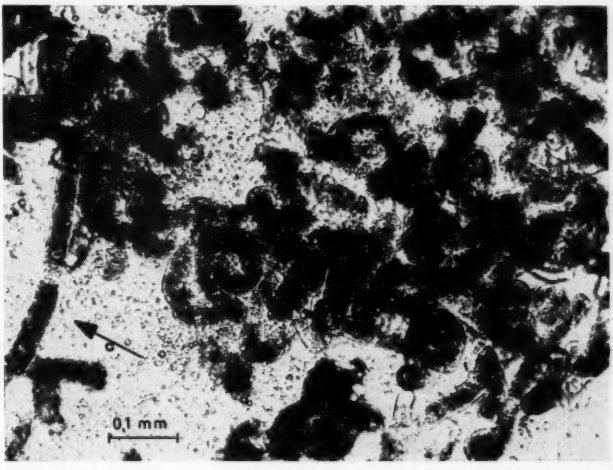


Abb. 6. *Gregarina cuneata* und *Gregarina polymorpha*. Stark befallener Darm einer *Tenebrio*-Larve. In dem zähflüssigen Schleim bewegen sich die Tiere „aktiv", an weniger zähen Stellen geht jedoch die „aktive" Bewegung sofort in die Gleitbewegung über (Pfeil).

In frischen Präparaten zeigten manche freibeweglichen Syzygien ein eigenartiges Verhalten. Knapp hinter dem Protomeriten krümmte sich der Primit (erstes Tier einer Syzygie) langsam nach rechts oder links, um dann ruckartig in die Normallage zurückzuschnellen. Zunächst konnte diese Bewegung nicht gedeutet werden, bis durch einen Zufall eine ähnliche Bewegung in einem noch nicht geöffneten Darm entdeckt wurde. Die Tiere knickten an der gleichen Stelle um wie oben beschrieben, doch war es hier der Deutomerit mit dem anhängenden zweiten Tier, der diese halbseitige „Pendelbewegung" ausführte. Der Darm wurde vorsichtig aufpräpariert — jetzt war deutlich zu erkennen, daß die Syzygie mit dem Protomeriten am Darmepithel festhaftete. Bei einer einseitigen, lokal begrenzten Kontraktion eines oder mehrerer Längsmyoneme mußte die ganze Syzygie hinter der Knickstelle umschwenken (Abb. 5). An jenen Syzygien aber, die durch die Präparation vom Epithel abgestreift waren, krümmte sich dagegen bei einer Kontraktion an der gleichen Stelle der leichtere Teil der Tiere, eben der Protomerit. Eine Deutung dieses Verhaltens ist nicht leicht. Da ein Anheften der Gregarinen vor der

Syzygienbildung beschrieben wird (Göhre 1943), wäre es denkbar, daß diese Klappbewegung das Loslösen der Syzygie von der Darmwand ermöglichen oder zumindest unterstützen soll.

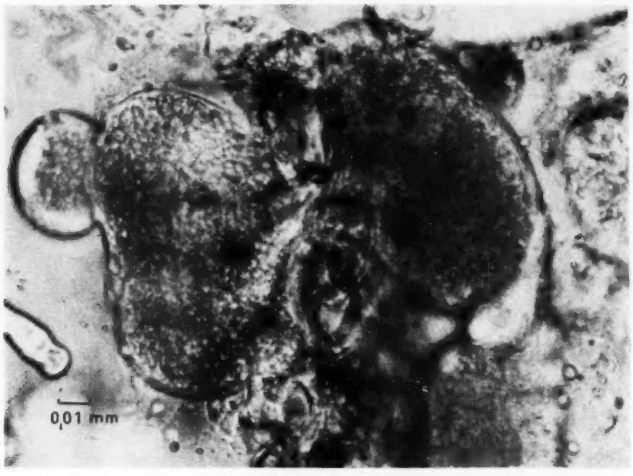


Abb. 7. *Gregarina cuneata*. Eine Syzygie zwängt sich durch eine kleine Öffnung unter völliger Deformation ihrer Gestalt.

2. Die „aktive" Bewegung

Bei der Beobachtung noch nicht aufpräparierter Larvendärme zeigte sich, daß die Mehrzahl der durch die Darmwand sichtbaren Tiere nicht gestreckt war. Deshalb wurden einige Präparationen nicht in Kochsalzlösung vorgenommen, sondern die in dem ausfließenden Darminhalt sich befindenden Gregarinen ohne Verdünnung des sie umgebenden Schleimes beobachtet (Abb. 6). Hier bot sich reichlich Gelegenheit, die in der Literatur wenig erwähnte „aktive" Bewegung der Gregarinen zu studieren. Unter ständiger Veränderung der Körpergestalt drängten sich die Tiere durch die vis-

Abb. 8. Die gleiche Stelle des Präparates 3½ Minuten später.

köse Masse und an anderen Artgenossen vorbei (Abb. 7 und 8). Sie zwängten sich durch kleinste Öffnungen, wobei ihre Gestalt völlig

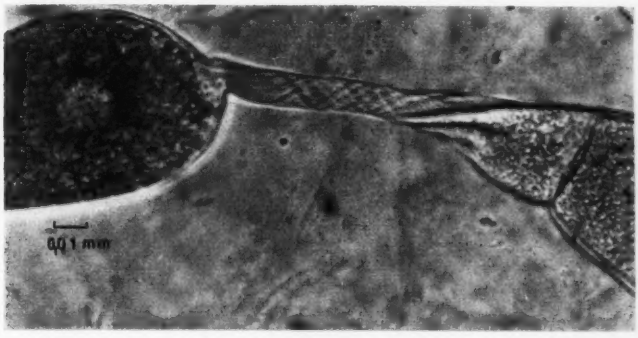


Abb. 9. *Gregarina cuneata*. Die Tiere drehen sich bisweilen um ihre Längsachse; kann der Satellit dabei dem Primiten nicht folgen, kommt es zu einer pathologischen Syzygie.

deformiert wurde. Die Tiere führten bei dieser Fortbewegung oft Drehungen um die Längsachse aus. Konnte dann der Satellit einer solchen Drehbewegung nicht folgen, so kam es zu einer pathologischen Syzygie, wie sie Abb. 9 zeigt. In derartigen Präparaten war der Kern im Augenblick des Durchtritts durch einen Engpaß sehr gut zu sehen; normalerweise kann man ihn in dem mit Reservestoffen stark angefüllten Protoplasma nicht erkennen (Abb. 10).

Gibt man Kochsalzlösung zu, so beobachtet man zunächst eine Quellung des Schleimes, in deren Verlauf sich alle Gregarinen zu strecken beginnen.

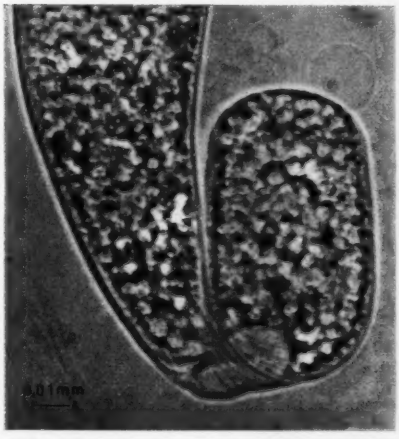


Abb. 10. *Gregarina* sp. Durch die Gestaltsveränderungen wird der Kern der Tiere sichtbar. Er wird im Verlaufe der Krümmungsbewegung oft deformiert.

Tiere, die an die Grenzfläche Schleim—Wasser stoßen, strekken sich plötzlich (Abb. 11), verlassen den Schleim und bleiben dann mit dem Hinterende an dem etwas zähen und wohl klebrigen Schleim haften. Löst man die Tiere mit einer Präpariernadel ab, oder gelingt es einigen von ihnen, sich selbst zu befreien, so bewegen sie sich nur noch gleitend vorwärts (Abb. 12).

Sollte die Art der Bewegung von der Viskosität der umgebenden Flüssigkeit abhängen? Um diese Frage zu bejahen, müßte der

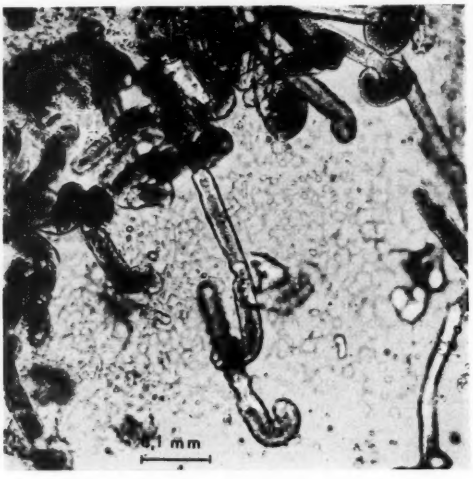


Abb. 11. *Gregarina polymorpha.* Die Streckung der Tiere erfolgt an der Grenzfläche Schleim-Wasser ruckartig, im gequollenen, nur noch wenig zähen Schleim dagegen langsam.

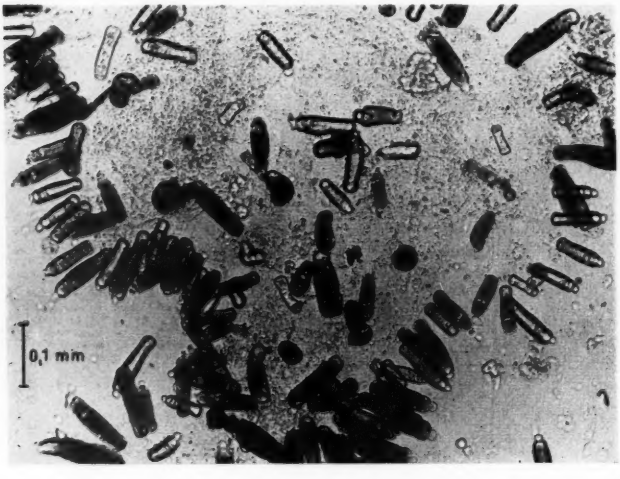


Abb. 12. *Gregarina polymorpha.* Nur wenige Tiere vermögen sich vom Schleim zu lösen und bewegen sich gleitend, die Mehrzahl bleibt mit dem Hinterende am Rand des Schleimballens hängen.

oben dargestellte Vorgang umkehrbar sein. Es wurde dazu folgender Versuch durchgeführt: Auf einen Objektträger wurden einige Körnchen einer quellbaren Substanz (Pharmazeutisches Präparat „Komma") mit den in der Kochsalzlösung befindlichen Gregarinen zusammengegeben und das Deckglas rasch mit Paraffin umrandet. Vorausgesetzt, daß die Menge der verwendeten Substanz richtig bemessen war, konnte man jetzt beobachten, daß die Gregarinen die Gleitbewegung einstellten und sich unter Krümmen und Winden weiterbewegten (Abb. 13).

Abb. 13. *Gregarina polymorpha.* Die Bewegungsfreiheit dieses Tieres wird durch das Quellen der dem Präparat zugefügten Substanz eingeschränkt. Erste Anzeichen der „aktiven" Bewegung sind am Protomeriten deutlich sichtbar, der Deutomerit zeigt eine schwache wellenförmige Kontur.

3. Die Cystenbildung

Eine Untersuchung der Bewegungsformen bei Gregarinen wäre unvollständig, ließe man die Vorgänge, die zur Bildung der Cyste führen, außer

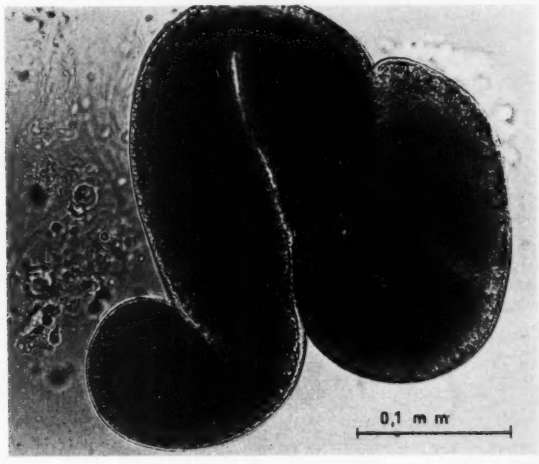


Abb. 14. *Gregarina polymorpha.* 17 Minuten nach den ersten Kontraktionen des Primiten greift die „aktive" Bewegung auch auf den Satelliten über.

acht. Besonders im Frühjahr und Herbst hat man reichlich Gelegenheit, das Entstehen einer Cyste zu verfolgen. Neben zahlreichen, in gutem Ernährungszustand befindlichen Syzygien findet man dann in den Larven-

därmen jene kugeligen Gebilde, in denen sich zwei Tiere eingeschlossen haben. Nach Bütschli (1881) werden die Individuen einer Syzygie allmählich dicker; sie verkürzen sich dabei, bis eine Kugel entsteht, die sich dann mit Schleim umgibt. Leider ist nicht gesagt, bei welcher Gattung die Encystierung in dieser Weise abläuft.

Watson (1916) untersucht diesen Vorgang bei verschiedenen Arten, wie *Gregarina rigida* Ellis, *Gregarina galliveri* Watson und *Stenophora erratica* Crawley. Ihre Angaben decken sich im wesentlichen mit den

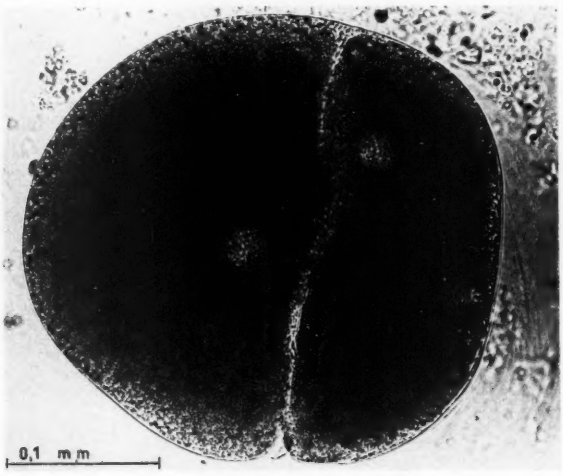


Abb. 13. Gleiches Tier wie in Abb. 14. Die Syzygie ist nach weiteren 10 Minuten zur Rotation übergegangen. Die Gallertfäden haben sich durch die Drehbewegung um die Tiere gelegt.

hier mitgeteilten Beobachtungen bei *Gregarina cuneata* und *polymorpha*. (Die Untersuchungen wurden ausschließlich an Präparaten, die mit Kochsalzlösung hergestellt waren, vorgenommen.)

Die Cystenbildung wird durch eine lebhafte Bewegung eingeleitet, die zunächst nur vom Primiten ausgeführt wird. Das Tier „schwenkt" hin und her. Nach 10 bis 20 Minuten greifen die Kontraktionen der Myoneme langsam auch auf das zweite Tier über (Abb. 14).

Bald befindet sich die ganze Syzygie in einer lebhaften Bewegung, die aber nahezu auf der Stelle ausgeführt wird. Zwanzig bis dreißig Minuten nach den ersten Kontraktionen geht das richtungslose Winden der Tiere langsam — ohne daß sich dabei die Intensität der Gesamtbewegung verändert — in eine Rotation über (Abb. 13). Der Vorgang vom Beginn der Cystenbildung bis zu einem scheinbaren Stillstand des Cysteninhaltes dauert mehrere Stunden.

Daß die Encystierung nicht ein einfaches Abkugeln oder „Zusammen-

rollen" ist, sondern der Vorgang von mehreren Faktoren bestimmt wird, zeigt folgender Fall:

Der Primit einer Syzygie begann mit der oben geschilderten Bewegung: jedoch verhielt sich der Satellit nach vierzig Minuten noch vollkommen passiv. Der Primit stellte kurz darauf die windende Bewegung ein, streckte sich und nahm die Gleitbewegung wieder auf. Leider kam diese Syzygie im Laufe des Beobachtungszeitraumes nicht mehr zur Encystierung.

Die von Watson (1916) beschriebenen Cystenbildungen scheinen weniger kompliziert zu verlaufen. Die Autorin berichtet dazu, daß die

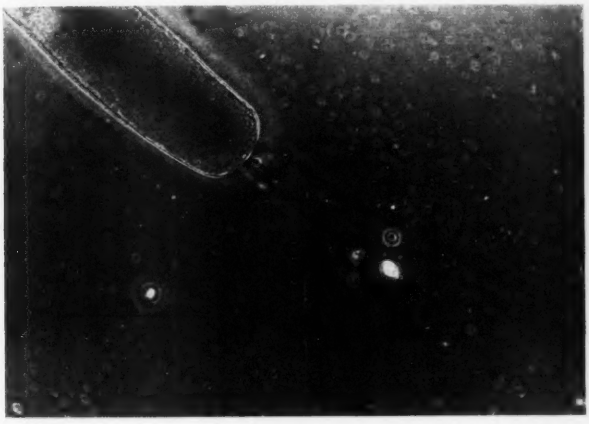


Abb. 16. *Gregarina cuneata.* Am Hinterende der Syzygie treten zu Beginn der Cystenbildung Gallertfäden aus. Der Beginn der Abscheidung fällt mit den ersten Krümmungsbewegungen des Primiten zusammen.

Tiere sich kreisförmig bewegen und am Ende des Satelliten Fäden oder Bündel von Fäden angeheftet seien. Tatsächlich finden wir bei allen Syzygien, die zur Cystenbildung übergehen, ein „Bündel von Fäden" am Hinterende „angeheftet". Hier wird wirklich eine gallertige Substanz ausgeschieden, die sich ohne weiteres optisch vom Medium unterscheidet (Abb. 16). Das Bündel ist an der Austrittsstelle noch dünn, die „Fäden" divergieren dann, wahrscheinlich durch Quellung unter dem Einfluß des Mediums. Der Beginn der Gallerteabscheidung fällt mit den ersten Krümmungsbewegungen des Primiten zusammen. So wird schon ein ansehnlicher „Schweif" gebildet, ehe die Cyste mit der Rotation beginnt.

Der oben beschriebenen, die Cystenbildung einleitenden Bewegung der Syzygie kommt eine funktionelle Bedeutung zu. Untersucht man den Inhalt einer Cyste, so fällt es immer wieder auf, daß kaum Fremdpartikel darin eingeschlossen sind. Würden sich die Tiere nur einfach zusammenrollen, wäre ein Einschluß zahlreicher Nahrungsrückstände des Wirtstieres unvermeidbar. Der Protomerit gleitet aber derart dicht am

Deutomeriten und dann der ganze Primit am Satelliten entlang, daß anliegende Verdauungsrückstände der Larve nicht dazwischen gelangen, sondern seitlich abgedrängt werden. Dieser Vorgang wird durch die schon ausgetretenen Gallertfäden noch unterstützt, die ein Zurückfließen der Schmutzpartikel verhindern.

IV. Teilbild-Analyse der Bewegungsvorgänge

1. Die Gleitbewegung

Schon die subjektive Beobachtung läßt erkennen, daß die Gleitbewegung nicht kontinuierlich über eine größere Strecke, sondern ruckweise erfolgt. Das Gleiten wird von einer „Ruhepause" unterbrochen, in der das Tier völlig still liegt. Die Bewegung selbst verläuft derart rasch, daß eine graphische Darstellung der innerhalb eines solchen Schubes zurückgelegten Wegstrecke ohne den Film als Hilfsmittel nicht möglich ist. Dies gilt um so mehr, wenn mehrere Tiere gleichzeitig zu beobachten sind.

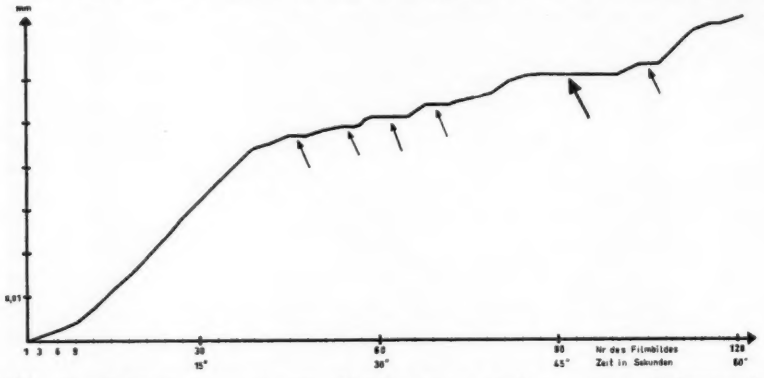


Abb. 17. *Gregarina cuneata.* Die Gleitbewegung wird von einer „Ruhepause" unterbrochen (starker Pfeil), die von einigen „Vor- und Nachpausen" begleitet wird.

Abb. 17 zeigt eine graphische Darstellung der Gleitbewegung einer noch jungen *Gregarina cuneata.* Der zurückgelegte Weg konnte durch Ausmessen eines jeden Teilbildes exakt festgelegt werden; er ist auf der Ordinate in Millimetern aufgetragen. Die Aufnahmen sind mit der geringen Raffung auf $^1/_8$ bzw. $^1/_{16}$ hergestellt, das heißt, der zeitliche Abstand zweier aufeinanderfolgender Bilder beträgt ½ bzw. 1 Sekunde. Die Teilbilder dieser Einstellung — folglich auch die Zeit — sind auf der Abszisse dargestellt.

Die Weg-Zeit-Kurve beginnt mit einem relativ flachen Anstieg, der bald steiler wird (Filmbild 9). Die Geschwindigkeit fällt von Bild 38 an wieder ab, das Tier bewegt sich langsamer und kommt zur Ruhe. Nach knapp 1,5 Sekunden wird die Bewegung wieder aufgenommen; doch ist der neue Schub erheblich kürzer. Dieser Wechsel zwischen Bewegung und Stillstand vollzieht sich noch mehrmals, bis es zu einer längeren „Ruhe"-

Pause von Teilbild 87 bis 100 kommt. Verfolgt man die Bewegung über die gesamte Einstellung von 497 Teilbildern, so ergibt sich, daß die Länge der in einem Schub zurückgelegten Wegstrecke ständig variiert, doch liegt zwischen zwei größeren immer eine Schar kleinerer Schübe. Die Geschwindigkeit des 0,033 mm langen Tieres betrug auf der hier zwischen Bild 1 und 40 dargestellten Strecke 0,044 mm / 20 Sek.. oder 0,131 mm / Minute. Die Durchschnittsgeschwindigkeit über die gesamte Einstellung liegt natürlich niedriger und erreicht bei diesem Tier den Wert von 0,039 mm/Minute. Die höhere Geschwindigkeit und damit die größere Länge des Schubes zu Beginn der Einstellung spricht für die Beobachtung von Watson (1916), daß Kochsalzlösung eine stimulierende Wirkung ausübt.

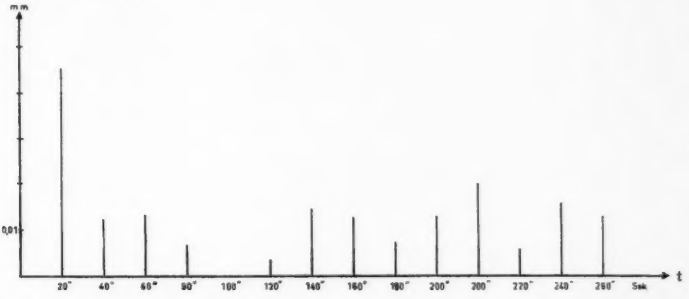


Abb. 18. Das gleiche Tier wie Abb. 17. Der in 20 Sekunden zurückgelegte Weg wird in dem entsprechenden Zeitpunkt als Senkrechte aufgetragen.

Die nächste Abbildung (Abb. 18) zeigt noch einmal die Meßwerte dieser Einstellung in einer anderen Darstellungsweise. Es wurde der jeweils in einem bestimmten Intervall zurückgelegte Weg als Senkrechte in dem zugehörigen Punkt der Abszisse errichtet und dabei ein Abstand von 20 Sekunden gewählt. Die erste Senkrechte stellt also den in den ersten 20 Sekunden dieser Einstellung von diesem Tier zurückgelegten Weg dar, die zweite Senkrechte den von der 20. bis zur 40. Sekunde zurückgelegten Weg usw. Auf der Ordinate ist wieder das Maß für die Länge des Weges in Millimetern aufgetragen. Eine „Ruhepause" zeigt sich hier nur durch eine Verkürzung des in der betreffenden Zeiteinheit zurückgelegten Weges, sofern die Pause nicht länger als der gewählte Bildabstand ist. Trotzdem wurde diese Art der Darstellung vorgezogen, da sie den Charakter der Gleitbewegung besser wiedergibt als die Weg-Zeit-Kurve. Die einzelnen Schübe kommen durch die sinusförmige Linie, die die Endpunkte der Senkrechten miteinander bilden, deutlich zum Ausdruck (siehe auch Abb. 20).

Auf der anderen Seite soll der Eindruck vermieden werden, es könne eine exakte Angabe für die Bewegungsgeschwindigkeit der Gregarinen gemacht werden. Eine solche Angabe muß auf einem zahlenmäßig sehr großen Material basieren, da die Unterschiede in der Bewegungsgeschwindigkeit

mehrerer Tiere erheblich sind. Einer Meßreihe wurden die in der Tabelle angegebenen Zahlen entnommen; dabei wurde der von den Tieren in 2 Minuten zurückgelegte Weg auf 120 Teilbildern ausgemessen. Zum Vergleich wurde die Länge der Gregarinen ebenfalls gemessen.

Länge des Tieres in mm	Weg in mm in 2 Min.	Länge des Tieres in mm	Weg in mm in 2 Min.
0,078	0,427	0,051	0,188
0,059	0,132	0,047	0,174
0,060	0,296	0,085	0,432
0,046	0,356	0,088	0,608
0,105	0,405	0,044	0,232
0,055	0,160	0,041	0,100
0,090	0,331	0,070	0,374
0,060	0,321	0,075	0,482
0,051	0,183	0,052	0,165
0,064	0,253	0,061	0,137

Zur Gewinnung der Meßpunkte wurden die gezeichneten Teilbilder einer Einstellung in einer Zeichnung vereinigt (Abb. 19). Dabei fiel es auf, daß einmal die Punkte für ein Tier oder eine Syzygie auf einem nahezu vollkommenen Kreis oder Kreisbogen lagen, in anderen Fällen jedoch auf einer mehr oder weniger geraden Linie. Eine aktive Richtungsänderung während der Gleitbewegung ist niemals beobachtet worden. Wie kam dann die kreisförmige Bahn eines Tieres zustande? Zeichnet man zu jeder Bahn den Umriß des betreffenden Tieres, so stellt man fest, daß jede Abweichung von der normalen, geradlinigen Bahn durch eine atypische Körperform bedingt ist. Eine rechtsseitige Krümmung des Tieres führt zu einer rechtsgerichteten Kreisbewegung und umgekehrt. Der Radius dieses Kreises ist von der Stärke der Krümmung abhängig. Solche atypische Körperformen finden sich, vermutlich bedingt durch die Entwicklung in der Spore, ausschließlich bei jungen Tieren, sie wurden nie bei älteren Gregarinen beobachtet. Auch eine Abweichung von der normalen Anhaftungsstelle des Satelliten kann einen Einfluß auf die Bahn haben (Tier I in der Abb. 19). Für derartige Beobachtungen eignen sich nur solche Tiere, deren Bahnen keine oder nur geringfügige Störungen durch Zusammenstöße mit anderen Tieren erlitten haben. Jeder Anprall an ein Hindernis wird durch einen in der Bewegungsbahn auffallenden Knick erkennbar.

Mühl (1921) hat bei den von ihr untersuchten Gregarinen ein Einknicken während der Gleitbewegung beobachtet; dabei ergab sich eine direkte Abhängigkeit des Radius der von diesem Tier zurückgelegten Kreisbahn vom Knickwinkel des Tieres. Sie zog aber aus dieser Beobachtung keine Schlüsse auf die etwaige Ursache der Lokomotion.

Die Frage, ob es bei Gregarinen eine Rückwärtsbewegung gibt, wird in der Literatur verschieden beantwortet. Es können hier die Beob-

achtungen von Watson (1916) bestätigt werden, daß es kein Rückwärtsgleiten gibt. Ein solcher Vorgang wird aber manchmal vorgetäuscht, wenn ein noch so unscheinbarer Schleimrest am Hinterende des Tieres an einem Hindernis hängen bleibt. Die Gregarine kann sich gegen den zunehmenden Widerstand des elastischen Schleimes zunächst ein Stück vorwärtsbewegen, wird dann aber infolge der

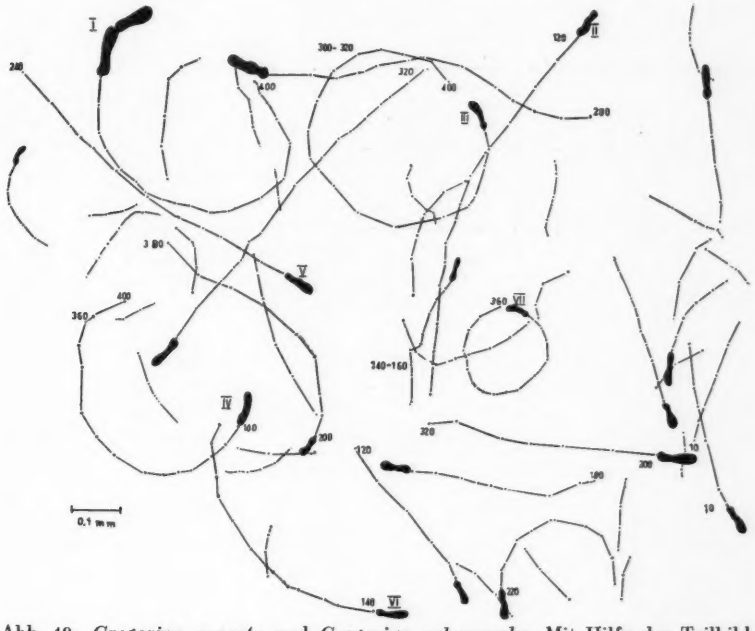


Abb. 19. *Gregarina cuneata* und *Gregarina polymorpha*. Mit Hilfe der Teilbildanalyse wird der von den verschiedenen Gregarinen zurückgelegte Weg aufgezeigt. Es wird die Stellung der Tiere nach jeweils 20 Teilbildern = 20 Sek. festgehalten. Dabei ergab sich eine Abhängigkeit der Form des zurückgelegten Weges von der Gestalt des Tieres.

Elastizität „zurückgeholt". Mit Hilfe des Mikromanipulators gelang es, solche Gregarinen vom anhängenden Schleim zu befreien; darauf wurde ein „Rückwärtsgleiten" der betreffenden Tiere nicht mehr beobachtet.

2. Bewegungsphysiologisches Verhalten in saurem und alkalischem Medium

Die Tiere der hier untersuchten Arten *Gregarina polymorpha* und *Gregarina cuneata* verhielten sich vollkommen gleich; artspezifisches Verhalten war nicht festzustellen. Diese Beobachtung gilt für alle in dieser Arbeit mitgeteilten Versuche.

a) pH 7,0: Der Kochsalzlösung wurde nur die entsprechende Menge

Pufferlösung zugesetzt. Die Auswertung der Filmaufnahmen ergab keine Änderung des Verhaltens in bezug auf die reine Kochsalzlösung. Die Bewegung einiger Tiere ist in Abb. 20 dargestellt.

b) pH 6,5: Die Lösung wurde mit *n*/10 HCl angesäuert. Die Gleitbewegung blieb normal; es zeigten sich keine Veränderungen, die auf eine Wirkung der pH-Änderung zurückgeführt werden könnte. Nach Göhre (1943) hat das Plasma der von ihm untersuchten Arten *Gregarina polymorpha* und *Gregarina cuneata* einen pH-Wert von 6,4.

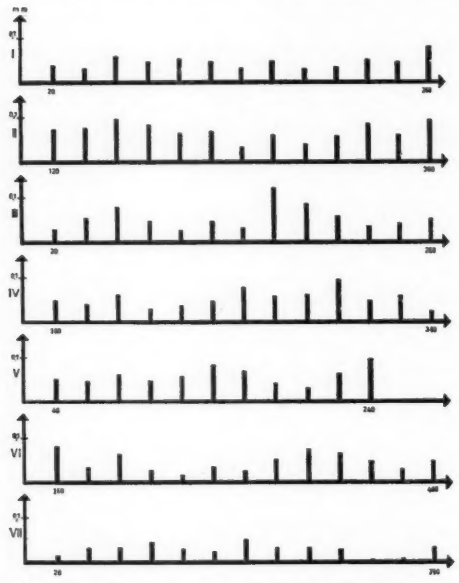


Abb. 20. *Gregarina* sp. Auf der Ordinate ist der Weg in Millimeter, auf der Abzisse die Zeit eingetragen. Der Abstand von Meßpunkt zu Meßpunkt beträgt 20 Teilbilder oder — bei der Raffung auf $^1/_{10}$ — 20 Sekunden.

c) pH 6,0: Abb. 21 zeigt den Einfluß der mit HCl angesäuerten Kochsalzlösung auf sehr kleine Gregarinen. Eine Bestimmung der Art läßt sich nicht mit Sicherheit vornehmen. Die Mehrzahl der hier abgebildeten Tiere bewegt sich nicht mehr. Die Gregarinen aber, die noch eine Lokomotion zeigen, bewegen sich, von zwei Ausnahmen abgesehen, auf der Stelle. Sie scheinen nur noch mit einem kleinen Teil ihrer Körperoberfläche an der Unterlage zu haften und drehen sich um diesen Punkt hin und her. Aber noch im Verlauf der kurzen hier aufgezeigten Phase stellen weitere Gregarinen die Bewegung ein, darunter auch jene kleine, die sich zunächst noch geradlinig fortbewegte.

Welchen Einfluß übt dieses Medium nun auf größere Tiere aus? Die geradlinige Bewegung des Gleitens wird noch beibehalten, doch ist sie langsamer geworden. Unabhängig davon beginnen die Tiere sich zu krümmen und wieder zu strecken (Abb. 22). Es ist weniger eine scharfe Knickung durch eine lokal begrenzte Kontraktion der Myoneme einer Seite als vielmehr ein Umbiegen. Wiederum liegt das Zentrum dieser Kontraktionen im ersten Drittel des Deutomeriten. Das Tier rechts oben in der Abb. 22 hat, ähnlich wie die kleinen Gregarinen, die Haftung mit der Unterlage zum Teil verloren (unscharf) und schwenkt daher in der Stärke der Einkrümmung mit dem ganzen Deutomeriten um die noch an der Unterlage haftende Stelle. Eine graphische Darstellung der Bewegung ist hier nicht mehr mög-

lich, da die Gleitbewegung von den Krümmungsbewegungen überlagert wird und beide nicht zu trennen sind.

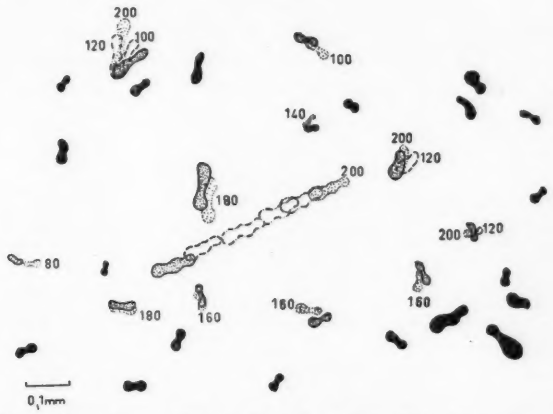


Abb. 21. pH 6,0. *Gregarina* sp. Noch in Bewegung befindliche Gregarinen (punktiert) führen „Drehungen" auf der Stelle aus. Anfangslage: Kontur ausgezogen. Die Zahlen geben die Nummer des Filmbildes an.

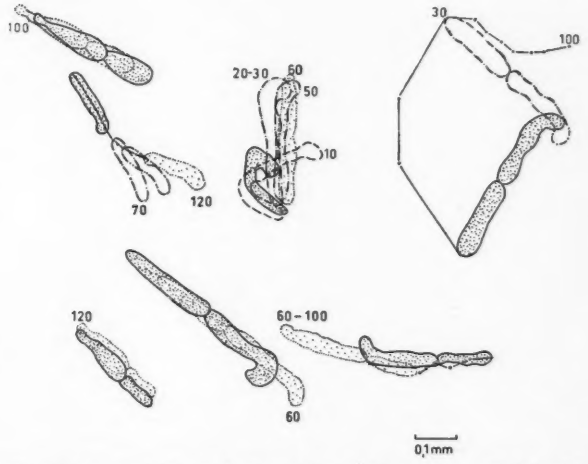


Abb. 22. *Gregarina cuneata* und *Gregarina polymorpha*. pH 6,0. Ältere Tiere. Gleitbewegung und Krümmungsbewegung überlagern sich.

Die Kontrolle dieses Präparates nach 3 Stunden ergibt, daß die „Gleitbewegung" inzwischen vollständig in eine durch starke Kontraktionen der Myoneme gekennzeichnete Bewegung übergegangen ist

(Abb. 23). Interessant ist, daß die Primiten wesentlich stärkere Kontraktionen zeigen als die Satelliten; diese scheinen mehr oder weniger passiv „nachgeschleppt" zu werden. Für den ganzen Vorgang ließe sich am besten der von Moser (1946) für eine Bewegungsart bei Monocystiden geprägte Ausdruck „Rundkriechen" anwenden.

Eine weitere Filmaufnahme nach 5 Stunden zeigt Abb. 24. Jetzt sind auch die Satelliten an der Krümmungsbewegung beteiligt. Doch machen die Tiere einen geschädigten Eindruck.

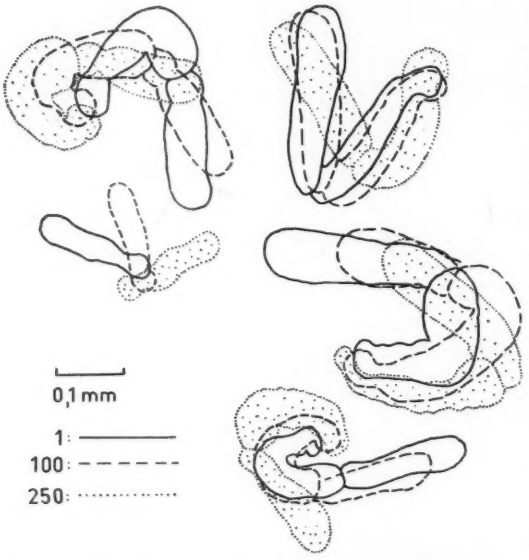


Abb. 23. *Gregarina cuneata* und *Gregarina polymorpha*. pH 6,0. Kontrollaufnahme von 5 Tieren nach 3 Stunden. Eine Gleitbewegung ist nicht mehr festzustellen. Das „Rundkriechen" geht allein auf die Tätigkeit der Myoneme der Primiten zurück, die Satelliten zeigen noch keine Gestaltveränderung.

Ein Kriterium für den Grad der Schädigung ist bei dem Mangel an Reaktionsäußerungen der Gregarinen kaum gegeben. Lediglich der Gesamteindruck des Tieres ermöglicht dem geübten Beobachter eine Beurteilung, inwieweit eine Schädigung vorliegt oder nicht. Hier ist der aufgequollene Deutomerit der Tiere und eine große hyaline Zone im ersten Deutomeriten einer Syzygie ein deutliches Anzeichen für eine Schädigung.

Das Verhalten der Gregarinen, wie es hier im Endstadium eines pH-Versuches beschrieben wird, schildert bereits Sokolow (1912) in seinen Arbeiten. Doch finden sich bei ihm keine Angaben über das bewegungsphysiologische Verhalten der Tiere in der Zeit zwischen dem Einbringen in das saure Medium und dem „Rundkriechen". Seine Deutung dieses Endstadium läßt vermuten, daß er den hier geschilderten langsamen Übergang von der Gleit- zur Rundkriechbewegung nicht beobachtet hat. Nach Sokolow hört die Gleitbewegung auf, weil im sauren Bereich kein Schleim mehr abgeschieden werden kann; sie wird durch die „aktive" Bewegung ersetzt. Da gerade dieser Übergang für das Gesamtbild der Gregarinenbewegung wesentlich erschien, wurde in weiteren Versuchen die Reproduzierbarkeit dieses Verhaltens festgestellt.

d) pH 5,0: Abb. 25 zeigt das Knicken und Strecken des Primiten

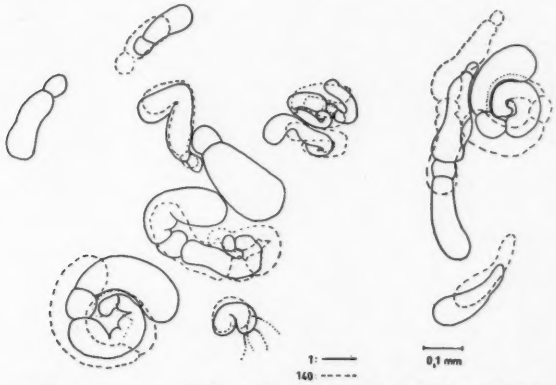


Abb. 24. *Gregarina cuneata* und *Gregarina polymorpha*. pH 6,0. Kontrollaufnahme nach 5 Stunden: Die Satelliten krümmen sich jetzt ebenfalls. Eine sichtbare Schädigung der Tiere ist eingetreten.

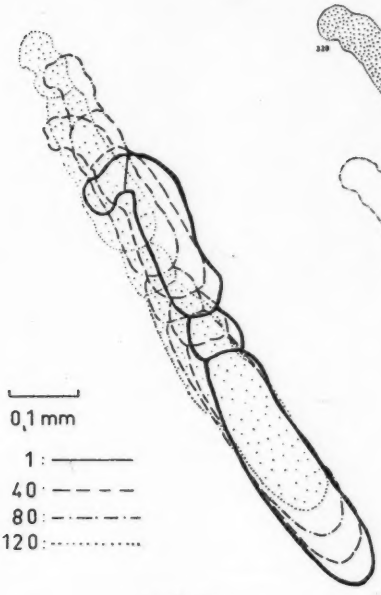


Abb. 25

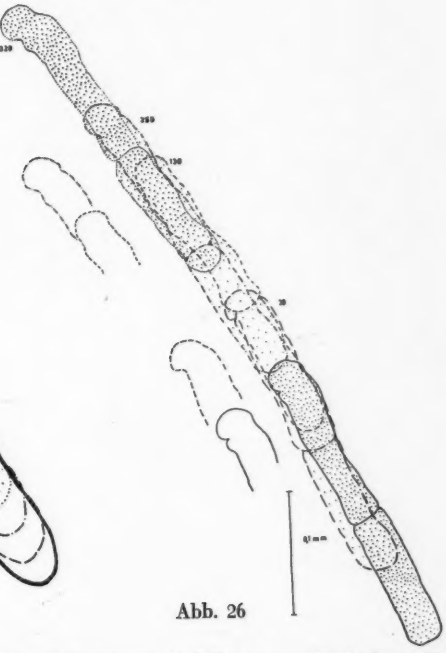


Abb. 26

Abb. 25. *Gregarina cuneata*. pH 5,0. Gleitbewegung und Krümmen überlagern sich immer stärker. Die Geschwindigkeit der Gleitbewegung ist deutlich geringer geworden.

Abb. 26. *Gregarina cuneata*. pH 4,5. Phasen der Bewegung einer Syzygie aus der Teilbildanalyse.

einer Syzygie in einem Medium mit dem pH-Wert 5,0. Das Verhalten der Tiere dieser Versuchsgruppe unterscheidet sich nicht von dem im vorigen

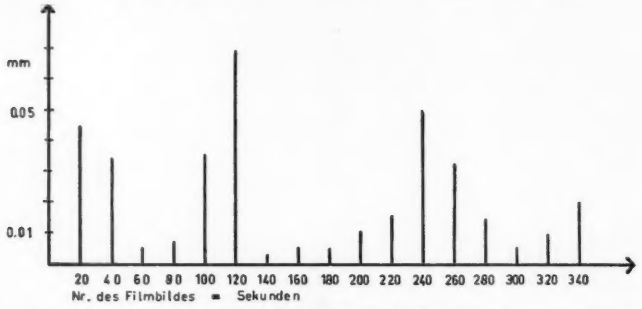


Abb. 27. *Gregarina cuneata*. pH 4,5. Der unregelmäßige Bewegungsverlauf dieses Tieres ist deutlich zu erkennen.

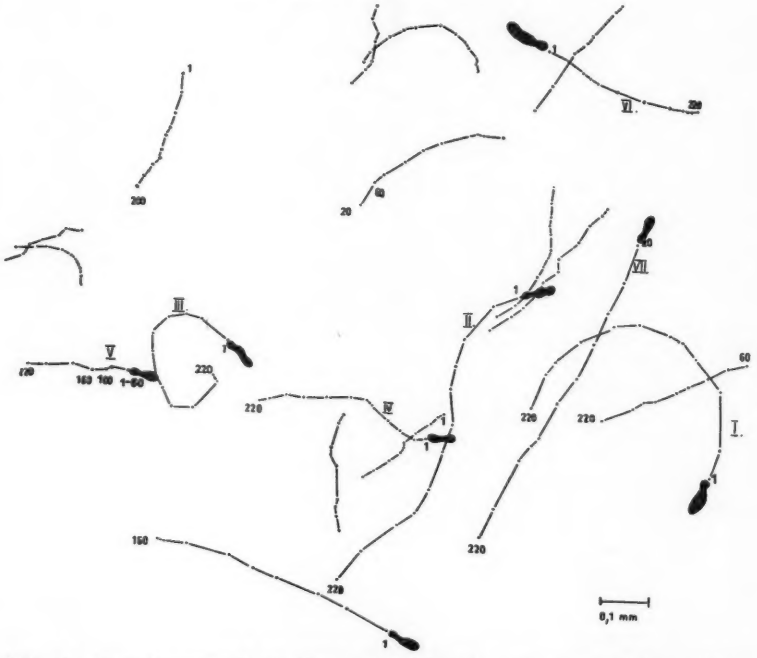


Abb. 28. *Gregarina* sp. pH 8,0. Durch Teilbildanalyse gewonnene Bahnen einiger Tiere. Die Zahlen geben das entsprechende Filmbild an. Die Bewegung zeigt keine sichtbare Abweichung (vergleiche Abb. 19).

Abschnitt geschilderten. Nur die Anzahl der Tiere, die sich noch bewegen, ist geringer geworden.

e) pH 4,5: Aus der Teilbildanalyse eines Präparates mit dem pH-Wert 4,5 wurden wieder einige Bewegungsphasen einer Syzygie herausgezeichnet (Abb. 26). Der zugehörigen graphischen Darstellung (Abb. 27) ist zu entnehmen, daß die Gleitbewegung nicht mehr gleichförmig abläuft, sondern durch die Knickbewegungen erheblich gestört wird. Diese Darstellung zeigt auch, daß man eine eventuelle Schädigung des Tieres der Kurve nicht entnehmen kann, da der Anteil der Knickbewegung an der Gesamtbewegung nicht faßbar ist. Wieder muß sich der Beobachter auf den Gesamteindruck des Tieres verlassen, das hier ohne Zweifel bereits eine Schädigung aufweist.

Weitere Untersuchungen mit pH-Werten unter 4,5 wurden nicht durchgeführt, da Vorversuche eine sofort eintretende starke Schädigung der Tiere ergaben.

Zur Ergänzung der Beobachtungen über das Verhalten der Gregarinen in sauren Medien dienten einige Versuche in alkalischer Kochsalzlösung.

f) pH 7,5: Die Tiere zeigen keine Änderung ihrer Bewegungsweise, die Gleitbewegung wird ohne Abweichungen beibehalten.

g) pH 8,0: Auch hier ist das Verhalten der Tiere zunächst unverändert. Abb. 28 stellt die Auswertung der Gleitbewegung einiger Einzeltiere und Syzygien dar.

Die Kontrollaufnahmen dieser Präparate nach 3 Stunden ergaben, daß sich die Tiere entweder kaum noch bewegten oder schon tot waren. Sie wiesen keine sichtbaren Schädigungen auf; lediglich auf Grund der Teilbildanalyse konnte der Tod festgestellt werden.

V. Untersuchungen an festgelegten Tieren

1. Zur Frage der Protoplasmaströmung

Eine wichtige Rolle bei der Lokomotion von Protozoen ist der Protoplasmaströmung zuzuschreiben. Auch bei *Monocystis agilis* Stein gelang es E. Moser (1946), mit Hilfe des Zeitrafferfilmes eine bisweilen heftige Strömung des Plasma nachzuweisen, die subjektiv oft erst nach Stunden sichtbar wurde. Solche Plasmabewegungen können durch die Lageveränderung der Granulen mit Hilfe der Teilbildanalyse sehr gut verfolgt werden. Das Erstaunliche an den Beobachtungen von Moser ist jedoch, daß solche Strömungsbewegungen zunächst von keinen Kontraktionen begleitet werden. Die Autorin berichtet, daß erst sehr viel später Kontraktionen und Dilationen auftreten. Diese Tatsache war die Veranlassung, ähnliche Untersuchungen an den hier bearbeiteten Objekten vorzunehmen, um gegebenenfalls einen Zusammenhang zwischen Gleitbewegung und Protoplasmaströmung aufzufinden.

Wie schon erwähnt, ist es dazu notwendig, eine Ortsveränderung des zu beobachtenden Tieres zu verhindern. Es gelang relativ gut, langgestreckte Syzygien mit Hilfe zweier Nadeln so festzulegen, daß sie sich zwar nicht mehr bewegen, aber schon bei einem geringen Nachlassen des Druckes ihre

Bewegung wieder aufnehmen konnten. Für die Auswertung wurden nur solche Einstellungen verwandt, die durch eine derartige Kontrolle erwiesen, daß die Gregarinen ungeschädigt waren.

Während die subjektive Beobachtung nur in einem einzigen Fall eine Granulabewegung erkennen ließ, zeigte schon das Zeitrafferlaufbild, daß in zahlreichen Tieren die Granulen eine deutliche Lageveränderung erfuhren. Es waren dies immer Tiere, deren Protoplasma nicht zu dicht mit Reservekörnern angefüllt war. Bei den Tieren, die sehr viel Paraglykogenkörner enthielten, ließ sich die Verschiebung der Granulen nicht feststellen. Die Teilbildanalyse des auf $^1/_{48}$ gerafften Filmes führte zu folgenden Ergebnissen:

Alle sichtbaren und verfolgbaren Protoplasmaeinschlüsse zeigen unter Zeitraffung mehr oder weniger große Ortsverlagerungen. Die Bewegung einer Anzahl Granulen bleibt auf eine bestimmte Fläche des Tieres im projizierten Bild beschränkt. Es sind oft die Granulen verschiedener Areale gleichzeitig zu beobachten (sofern sie gleichzeitig scharf abgebildet sind); dabei konnte eine „Granulawanderung" von einem Areal in ein anderes nicht festgestellt werden. Dieses Ergebnis bestätigt die von Kuhl (1949) ausgesprochene Vermutung einer unter Umständen geordneten Granulabewegung innerhalb kleiner Zellbezirke.

Wenn es gelingt, die Bewegung von Granulen in einer Zelle über längere Zeit zu verfolgen und auszumessen, lassen sich aus der Intensität dieser Bewegung Schlüsse auf die Viskosität des Plasma ziehen. In diesem Zusammenhang sind die Untersuchungen von W. Schwöbel (1952) und J. Lamina (1958) über die Granulabewegung im Ei von *Parascaris equorum* (Goeze) zu erwähnen.

Leider ließ sich in diesem Fall eine Aussage über die Viskositätsverhältnisse in Gregarinen nicht machen, da ein Verfolgen einzelner Granulen mit dem notwendigen Maß an Sicherheit nicht möglich war. Das war aber auch für diese Arbeit und insbesondere für die Feststellung einer Protoplasmaströmung in diesen Tieren nicht notwendig. Die Tatsache, daß sich eine geordnete Bewegung der Plasmaeinschlüsse nur in begrenzten Arealen aufzeigen ließ, erlaubt wohl die Schlußfolgerung, daß die in Arten der Gattung *Gregarina* auftretende Plasmaströmung keine ursächliche Bedeutung für die Gleitbewegung haben kann.

2. Die Strömung an der Gregarine

Der Transport kleiner Teilchen in der Nähe sich bewegender Gregarinen spielt eine große Rolle in der Literatur und wird immer wieder zur Stützung einer Theorie der Lokomotion durch Gallerteabscheidung herangezogen.

Um diesen Vorgang gut beobachten zu können, wurde Kaolin in der Kochsalzlösung suspendiert und diese mehrfach zentrifugiert. Auf diese Weise erhält man eine Lösung, die nur noch kleinste Kaolinpartikelchen enthält. Die Beobachtung der mit dieser Suspension hergestellten Präparate bestätigt die Angaben früherer Autoren, daß die Fremdpartikel, die die

Tiere berühren, entgegengesetzt der Bewegungsrichtung der Gregarine befördert werden. Um auszuschließen, daß es nur Strömungen durch die sich bewegende Gregarine sind, die den Transport der Kaolinteilchen bewirken, wurden Syzygien, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, mit Hilfe des Mikromanipulators festgelegt. Auch unter diesen Bedingungen zeigten die Kaolinpartikel eine Wanderung zum Hinterende des Tieres bzw. der Syzygie.

Durch die Auswertung der mit relativ starkem Objektiv (WE Pv, E. Leitz) aufgenommenen Versuche konnte die schon in einem früheren Abschnitt niedergelegte Beobachtung bestätigt werden, daß nur solche Partikelchen transportiert werden, die sehr engen Kontakt mit der Pellicula der Tiere hatten und — im Projektionsbild — teilweise durch die Gregarina verdeckt wurde. Die Werte für die Geschwindigkeit des Kaolintransportes lagen in der gleichen Größenordnung wie die der Gregarinenbewegung selbst, sogar die „Ruhepausen" äußerten sich in einem Stillstand der Kaolinteilchen (Abb. 29).

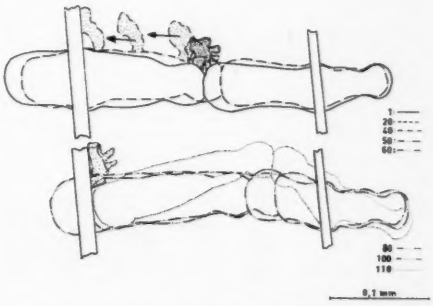


Abb. 29. *Gregarina cuneata.* Phasen der Teilbildanalyse einer festgelegten Syzygie. Die Nadel links etwas gelockert, so daß sich der Satellit darunter vorschieben kann. Links neben dem Tier Kaolinteilchen (punktiert).

Abweichungen in den Zahlenwerten ergeben sich durch die Versuchsbedingungen und aus der Tatsache, daß eine exakte Festlegung der Mittelpunkte der Koalinteilchen, die durch Zusammenballung unregelmäßige Formen annahmen, nicht möglich ist.

Welche Folgerungen ergeben sich aus diesen Versuchen? 1. Unter diesen Versuchsbedingungen geben die Tiere keineswegs sämtliche Bewegungsäußerungen auf, sondern zeigen durch den Transport der Kaolinteilchen, daß der Bewegungsmechanismus nach wie vor abläuft und nicht eingestellt wird. Durch die Festlegung wird nur die Wirkung aufgehoben. 2. Die Versuchsanordnung beweist die Tatsache, daß die Partikel immer von vorn nach hinten befördert werden, daß sich die Gregarinen folglich nur in einer Richtung und zwar vorwärts bewegen. 3. Die Beobachtungen lassen einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Transport dieser Teilchen und dem Vorhandensein und Ausscheiden einer schleimartigen oder gallertigen Masse nicht zwingend notwendig erscheinen. Ein solcher Zusammenhang setzt voraus, daß der austretende Schleim niemals seitlich des Tieres hervorquillt. Die Annahme eines „anisotropen Schleimes" (Prell 1921), der nur in einer Richtung verquillt, ist wesentlich umständlicher als die Erklärung dieses Körnchentransportes durch kleine Wel-

lenbewegungen, hervorgerufen durch die Tätigkeit der zweifelsfrei vorhandenen Myoneme. Es ist klar, daß sich die Beobachtungen ebensogut mit Hilfe der Sekretionshypothese wie mit Kontraktionen erklären las-

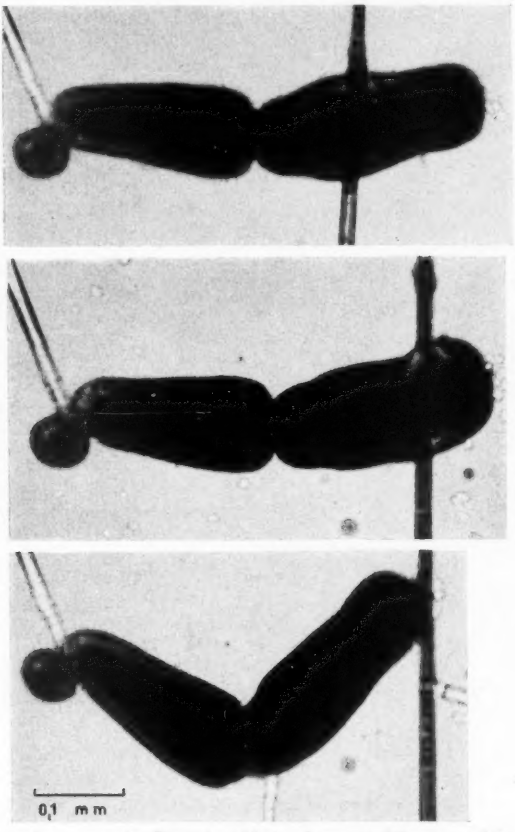


Abb. 30. *Gregarina cuneata*. Drei im Abstand von 1 Minute aufeinanderfolgende Teilbilder aus einem Mikrozeitrafferfilm. Der Satellit einer Syzygie schiebt sich unter der Nadel durch. Im zweiten Teilbild ist eine Stauung des Plasma im Deutomeriten des Satelliten zu sehen.

sen: doch sind die Voraussetzungen, die erstere stellen muß, sehr unwahrscheinlich.

Es war selbst mit Hilfe des neuen Mikromanipulators von E. Leitz nicht leicht, gerade den Druck auf die Tiere auszuüben, der sie an der Fortbewegung hindert und sie noch nicht schädigt. Oft gelang es den Syzygien noch, sich gleitend trotz des starken Druckes der Nadeln unter denselben hervorzuschieben (Abb. 30 *a*—*c*).

VI. Unter Zeitraffung sichtbare Kontraktionen während der Gleitbewegung

Im Verlauf der Untersuchungen fielen immer wieder einzelne Gregarinen auf, die eine eigenartige Veränderung ihrer Gestalt zeigten: Die Deutomerite dieser Tiere waren beiderseits eingekerbt; bisweilen liefen „Schnürfurchen" über den Deutomeriten. Abb. 31 zeigt ein solches Tier. Man gewinnt den Eindruck einer Gliederung des Tieres in einzelne „Segmente". Solche Einschnitte in der Pellicula der Gregarinen können nur von anhaltenden Kontraktionen der Myoneme hervorgerufen werden. An den Tieren fiel auch sofort eine Verkürzung des Deutomeriten auf.

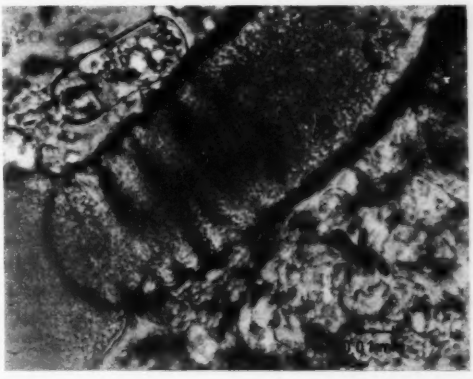


Abb. 31. *Gregarina polymorpha.* „Einkerbungen" im Deutomeriten einer Gregarine in sehr zähem Schleim.

Zunächst schien das Auftreten dieser Kontraktionen eine Folgeerscheinung des abgeänderten Mediums zu sein, da das Präparat, in dem zum ersten Mal eine derart kontrahierte Gregarine beobachtet wurde, mit einer 0,8%igen NaCl-$CaCl_2$-Lösung im Verhältnis 2 : 1 hergestellt war. Eine Bewegung des Tieres in diesem Präparat war subjektiv nicht festzustellen. Die erste Vermutung, es handelte sich um den Einfluß der Calciumionen, konnte in der nachfolgenden Versuchsreihe nicht bestätigt werden. In der Folge fand sich dieses Verhalten bisweilen auch in der reinen Kochsalzlösung. Bei der Präparation des Darmes eines Wirttieres fiel die besonders große Zähigkeit des Inhaltes auf. Als sich auch hier wieder die gleichen Kontraktionen zeigten und außerdem bei den Tieren subjektiv eine, wenn auch sehr langsame Gleitbewegung zu beobachten war, wurde dieses Präparat unter Zeitraffung auf $^1/_{16}$ aufgenommen.

Schon aus dem Laufbild war zu erkennen, daß die „seitlichen Einkerbungen" nicht starr waren, sondern wanderten. Aber erst durch die Teilbildanalyse war es möglich, die Veränderungen an der Pellicula zu verfolgen. In der Abb. 32 (obere Zeichnung) sind drei verschiedene Teilbilder wiedergegeben. Die ausgezogene Linie gibt den Umriß des Tieres in Teilbild 1, die –·–·–·– Linie denjenigen in Teilbild 40, das heißt 40 Sekunden später, an. Die punktierte Linie zeigt die Veränderungen der Kontur nach weiteren 20 Sekunden. Daß sich die Pellicula fortwährend verändert, ist bereits auf dieser Art der Darstellung zu ersehen; legt man jedoch die Teilbilder derart aufeinander, daß jeweils die Grenze zwischen Primit und Satellit zur Deckung kommt (untere Zeichnung), so kann man einen wellen-

förmigen Verlauf der Kontraktionen erkennen (siehe Pfeile in Abb. 32). Es handelt sich hier tatsächlich um peristaltische Kontraktionen der Myoneme, die immer von vorn nach hinten verlaufen, nie umgekehrt. Gleichzeitig ist aus Abb. 32 auch die Verkürzung des Tieres zu erkennen. Die Kontraktionen führen aber nicht zu einer Richtungsänderung der Gleitbewegung, sind also nicht identisch mit den einseitigen „Knickungen", die Mühl (1921) bei ihren Untersuchungen beobachtet hat und die zu den weiter oben schon geschilderten kreisbogenförmigen Bahnen führten. Hier bleibt die Bewegung mehr oder weniger geradlinig — sofern nicht andere Ursachen vorliegen — auch wenn die Kontraktionswellen nicht gleichmäßig auf beiden Seiten des Tieres verlaufen. Die mehrfache und sorgfältige Betrachtung des Zeitrafferlaufbildes bringt noch ein weiteres Ergebnis: Über die ganze Unterseite des Protomeriten verlaufen ebenfalls wellenförmige Bewegungen, die infolge der hier in geringerer Anzahl vorhandenen Granulen sichtbar werden (Abb. 33 *a*—*d*). Dabei erfährt die Pellicula des Protomeriten keine Veränderung wie die des Deutomeriten.

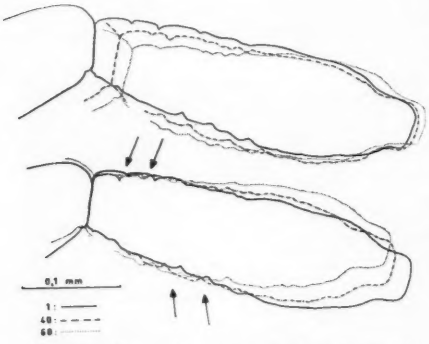


Abb. 32. *Gregarina polymorpha*. Durch die Teilbildanalyse des Zeitrafferfilmes ist das „Wandern" der seitlich sichtbaren Einkerbungen von vorn nach hinten einwandfrei zu erkennen. Oben in der Abbildung: Drei aufeinander projizierte Teilbilder. Unten: Die Bewegung des Tieres überdeckt die nach hinten verlaufenden Wellen; verschiebt man den Auswertrahmen so, daß die Grenze Primit—Satellit jeweils zur Deckung kommt, läßt sich der Verlauf der Wellen deutlicher erkennen.

Die Ursache dieser starken Kontraktionen war einwandfrei die zähe Konsistenz des Darminhaltes der Tenebriolarve. Wie schon weiter oben beschrieben, bleibt bei der Präparation der Tiere immer ein mehr oder weniger großer Schleimrest an den Gregarinen haften und zwar immer am Hinterende, begünstigt durch die Form der Tiere. Das Hinterende ist nicht wie ein abgerundeter Kegelstumpf ausgebildet, sondern der Kegelstumpf ist leicht nach innen eingedrückt. An den hier untersuchten Gregarinen, die derart ausgeprägte Kontraktionen zeigten, hing eine besonders große Menge dieses zähen Schleimes (Abb. 34), oder es waren darin größere Partikel eingelagert. Bei der weiteren Verfolgung des Schicksals dieser Tiere konnte festgestellt werden, daß sich der Schleim langsam in der Kochsalzlösung auflöste. Drei Stunden nach den Filmaufnahmen war die Bewegung dieser Gregarinen von der normalerweise zu beobachtenden Gleitbewegung nicht mehr zu unterscheiden. In einem anderen Präparat war der Rest des bei der Präparation geschädigten und geplatzten Primiten die Ursache für

die starken Kontraktionen (Abb. 33). Dieser Zufall vermittelt noch ein weiteres, nicht unwesentliches Ergebnis. An der Bewegung einer Syzygie

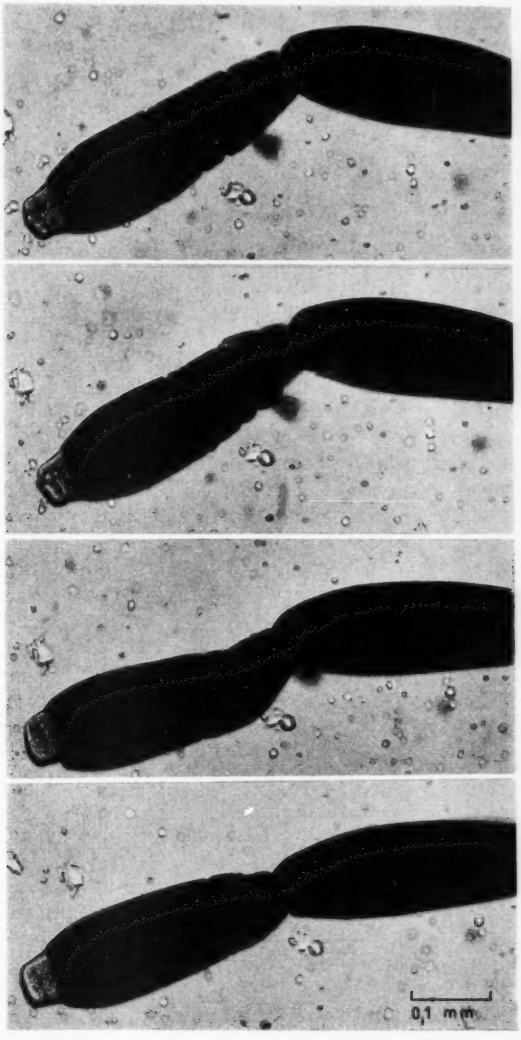


Abb. 33 *a—d. Gregarina polymorpha.* Bildabstand 40 Sekunden. An einer Syzygie sind während der Gleitbewegung von vorn nach hinten wandernde „Einkerbungen" zu sehen. Man achte besonders auf die Veränderungen im Protomeriten des Primiten, die selbst hier in der Abbildung einen wellenförmigen Verlauf erkennen lassen.

sind beide Partner — wahrscheinlich gleichmäßig — beteiligt. Es scheint nicht der Fall zu sein, daß nach der Vereinigung zweier Individuen

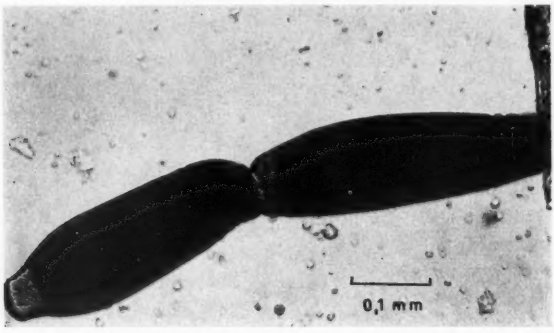


Abb. 34. Dasselbe Tier wie Abb. 33. Jetzt sind auch die Einschnürungen im Satelliten zu sehen. Ferner erscheint im Bildfeld der Rand des großen, zähen Schleimballens, die Ursache der „verstärkten Gleitbewegung".

zur Syzygie die Stoffwechselvorgänge, die zur Bewegung führen, nur in den Primiten verlagert werden. Der Meinung Göhres (1943) kann hier nicht zugestimmt werden, der auf Grund seiner rH-Messungen eine Verlagerung der Enzymaktivität in den Primiten annimmt.

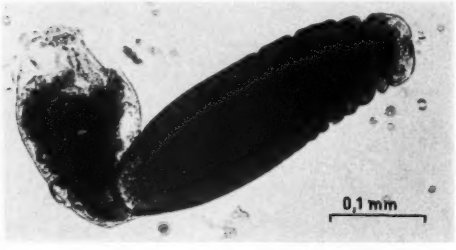


Abb. 33. *Gregarina polymorpha*. Ein Satellit „schiebt" die Hülle des geplatzten Primiten vor sich her.

Leider blieben die Bemühungen um eine messende Analyse der hier dargelegten Vorgänge erfolglos. Es war nicht möglich, bei der Teilbildanalyse auch nur einige Granulen mit Sicherheit zu verfolgen. Ebenso erging es mit den Einkerbungen der Pellicula, die bald verschwanden und bald wieder erschienen und nur selten exakt zu verfolgen waren. Dazu kommt noch die Überlagerung der Kontraktion des Tieres mit der Vorwärtsbewegung.

VII. Zur Reizphysiologie der Gregarinen

Abgesehen von den Arbeiten über die Bewegung liegen in der Literatur keine Hinweise auf physiologische Untersuchungen bei Gregarinen vor. Im Rahmen der von Sokolow (1912) durchgeführten Arbeiten über die Lokomotion stellen die Versuche mit anorganischen Salzen, Säuren, mit verschiedenen organischen Substanzen, die Temperaturversuche von Soko-

low (1912) und Mühl (1921) sowie die Arbeit von Ehrhard (1920) die gesamten Kenntnisse auf diesem Gebiet dar. Wesentlich genauer wurden die drei anderen Klassen der Protozoen untersucht, was sicher kein Zufall ist. Eine der Ursachen liegt wohl in der Reaktionsarmut der Sporozoen — hier also der Gregarinen — gegenüber qualitativ und quantitativ verschiedenen Reizen. Dazu kommt gerade bei Gregarinen die Schwierigkeit, ihren „Normalzustand" zu beurteilen: Tiere, die sich stundenlang nicht bewegen, müssen nicht unbedingt geschädigt sein. Andere, unter den gleichen Bedingungen hergestellte Präparate, können wieder recht lebhafte Einzeltiere und Syzygien aufweisen.

Abb. 36. *Gregarina polymorpha* und *Gregarina cuneata*. Durch Wärmeeinwirkung abgetötete Gregarinen. In fünf Fällen haben sich die Syzygienpartner noch getrennt.

Durch die Änderung des Zeitmomentes mit Hilfe des Zeitrafferfilmes wird die Möglichkeit gegeben, den Tod der Tiere, der nicht unbedingt mit einer subjektiv sichtbaren Veränderung der Gestalt verknüpft sein muß, zu erkennen. Die unter Zeitraffung sichtbar gewordene Granulabewegung in der lebenden Zelle ist das sichere Kriterium für die Vitalität; ihr Stillstand bedeutet, daß die Zelle tot ist und die subjektiv sichtbare Bewegungslosigkeit des Tieres keine „Ruhephase" darstellt.

1. Einfluß der Temperatur

Wärmeschädigungen gehören zu den Faktoren, mit denen man bei der hier angewandten Untersuchungsmethode rechnen muß; sie sind möglichst auszuschließen. Die aus diesem Grunde durchgeführten Vorversuche ergaben eine eindeutige Schädigung der Tiere erst bei einer Erwärmung auf 34°—36° C.

Schon eine längere Einwirkung von Temperaturen ab 29° C brachten die Gamonten zum Absterben. Es ist eigenartig, daß sich dabei die Tiere einer Syzygie lösen. Abb. 36 zeigt einige solcher Gregarinen. Aus der Lage zuein-

ander kann man noch auf die Zugehörigkeit zu einer Syzygie schließen. Die Tiere sind flach ausgebreitet und sehen stark gepreßten Gregarinen ähnlich. Der Kern ist deutlich zu sehen. Diese relativ niedrige Temperaturschranke liegt nicht nur bei den unnatürlichen Bedingungen des Präparates vor. Nach Beobachtungen von K. J. Marschall sind bei 28°—29° C gehaltene Tenebriolarven immer frei von Gamonten (unveröffentlichte Beobachtung).

Für die Durchführung dieser Arbeit ergab sich, daß eine Wärmeschädigung der Tiere während der Filmaufnahmen nicht eintrat.

Ein Einfluß steigender Temperaturen auf die Vitalität der Tiere in einem Bereich von 20°—28° C im Sinne einer Aktivierung, wie Sokolow (1912) es feststellte, war nicht zu beobachten. Schon Mühl (1921) hatte gefunden, daß im Bereich von 15°—28° C eine gleichmäßige Bewegungsintensität herrscht.

2. Lichtreiz

Ein Einfluß des Lichtes auf das Verhalten der Gregarinen — auch unter Anwendung von Vitalfarbstoffen, wie Neutralrot und Methylenblau — konnte nicht beobachtet werden. Nach Efimoff (1925) üben diese Farbstoffe eine sensibilisierende Wirkung aus (untersucht an Paramaecien). Ein Hell-Dunkel-Wechsel, wie er bei Verwendung der rotierenden Außensektorenblende bei den Filmaufnahmen vorkommt, hatte auf die Tiere keinen sichtbaren Einfluß.

3. Chemischer Reiz

Die von sauren und basischen Lösungen induzierten Änderungen in der Bewegung wurden im Kapitel IV, 2, eingehend beschrieben. Es ist noch nachzutragen, daß die Änderung des pH-Wertes nicht nur mit HCl, sondern auch mit H_2SO_4, HNO_3 und CH_3COOH vorgenommen wurde. Es konnte dabei kein unterschiedlicher Einfluß auf das Bewegungsverhalten festgestellt werden; lediglich bei Anwendung von Essigsäure fand sich immer eine Verzögerung des Wirkungseintrittes.

Ferner wurde das Natrium-Ion der Untersuchungsflüssigkeit ganz oder teilweise durch andere Kationen der Alkali- und Erdalkalisalze ersetzt. Ca^{++} zeigte einen starken negativen Effekt. Die Bewegung hörte nach wenigen Minuten auf. Die Gregarinen verloren fast völlig ihr Haftvermögen mit der Unterlage. Sie blieben nur mit einer kleinen Fläche des Hinterendes am Objektträger haften. Das Tier „bäumte" sich auf. Magnesium zeigte keinen Einfluß. Im allgemeinen waren die Ergebnisse derart indifferent, daß sich eine eingehende Betrachtung erübrigt.

Bei der Anwendung von Vitalfarbstoffen (siehe oben) war die Möglichkeit einer Vitalitätskontrolle der gefärbten Tiere mit Hilfe einer kurzen Filmaufnahme unter Zeitraffung von großem Wert; es ist sogar zu fordern, daß Vitalfärbungen möglichst auf diese Weise kontrolliert werden! Mühl (1921) berichtet in ihrer Arbeit von einer unterschiedlichen Anfärbung des Primiten und Satelliten. Die Autorin schließt daraus auf physiologische Unterschiede der Syzygienpartner. Eine entsprechende farbige Abbildung ist auch in das Buch von M. Hartmann

(1956), „Die Sexualität", übernommen worden. Schon Göhre (1943) wies darauf hin, daß hier wahrscheinlich Schädigungen vorlagen; er konnte auf Grund seiner rH-Messungen und Vitalfärbungen derartige Unterschiede nicht finden. Bei Vitalfärbungen zahlreicher Tiere konnte hier nie ein Unterschied in der Anfärbung einer Syzygie beobachtet werden. Der unter Zeitraffung aufgenommene Film einer solchen Syzygie wäre dann vielleicht ein Beweis gewesen für Göhres Vermutung einer Schädigung, der wir uns anschließen.

Wenn sich diese Arbeit zunächst mit der Bewegung der Gregarinen befaßt, so ist das Bestreben verständlich, auch der Ursache dieser Bewegung nachzugehen. Dabei ist es naheliegend, von den zahlreichen Untersuchungen über die Rolle des ATP bei der Muskelkontraktion (Weber 1955 u. a.) auszugehen und die Wirkung dieser Substanz auf das bewegungsphysiologische Verhalten der Gregarinen zu untersuchen.

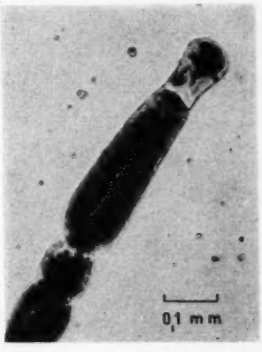


Abb. 37. *Gregarina cuneata*. ATP^{-2} M. Zusammenballungen im Protoplasma, zuerst nur in dem Protomeriten.

Ähnliche Arbeiten an Amöben durchgeführt, liegen vor von Goldacre und Lorch (1950), Kriszat (1950) und Käppner (1956). Das 5'-ATP $Na_2H_2.4\,H_2O$ (Boehringer, Mannheim) wurde zu den Versuchen immer frisch angesetzt und zwar mit 0,8%iger Kochsalzlösung. Es wurden drei Versuchsreihen durchgeführt: Die erste mit einer ATP-Konzentration von 1.10^{-2} M, die zweite von 1.10^{-3} M und schließlich eine 10^{-4} molare Lösung. Die Gregarinen wurden zunächst in Deckglaspräparaten einer Vitalitätsprobe durch eine kurze Zeitrafferfilmaufnahme unterworfen; darauf wurde das Normalmedium abgesaugt und die ATP-Lösung zugegeben. Das Absaugen ist möglich, weil die Gregarinen infolge ihrer klebrigen Oberfläche zum großen Teil am Glas haften bleiben (Crawley 1905).

In den mit der Konzentration von 10^{-2} M hergestellten Präparaten fiel bereits nach 10 Minuten auf, daß die Mehrzahl der zuvor sehr regen Tiere bewegungslos geworden war. Abb. 37 zeigt, daß das Protoplasma eine Zustandsänderung erfahren hat. Die Dichte der Granulen ist ungleichmäßig geworden; das wird besonders im Protomeriten des ersten Syzygienpartners deutlich. Auch scheint sich das Plasma von der Pellicula zurückzuziehen (Abb. 38).

Bei der Anwendung von 10^{-3} M ATP traten zunächst keine sichtbaren Reaktionen ein; in einem einzigen Fall verhielt sich eine Syzygie sehr auffällig. Unter normalen Bedingungen ist ein ähnlicher Vorgang im Verlaufe von zwei Jahren nie beobachtet worden, daher ist die Wahrscheinlichkeit, daß es sich hier um eine spezifische Reaktion handelt, recht groß. Entweder

ist ein bestimmter physiologischer Zustand zu diesem Verhalten notwendig, oder ein noch unbekannter Faktor hat zu diesem Ergebnis beigetragen. So

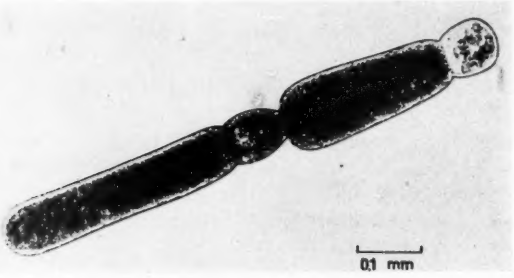


Abb. 38. *Gregarina polymorpha.* ATP 10^{-2} M. Das Plasma zieht sich von der Pellicula zurück.

war bisher leider eine Reproduktion nicht möglich. Aus den oben dargelegten Gründen soll dieses Ereignis dennoch mitgeteilt werden. Abb. 39 zeigt Phasen aus der Auswertung des Zeitrafferfilmes. Im Teilbild 1 (————), zwanzig Minuten nach ATP-Zugabe, sind eigenartige „Fältelungen" am Protomeriten des ersten Tieres der Syzygie zu erkennen, sogar kurz hinter dem Protomeriten ist eine Einschnürung zu

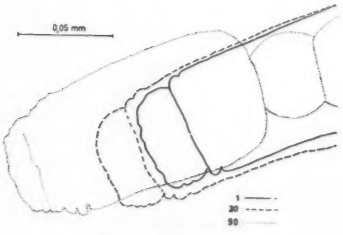


Abb. 39.

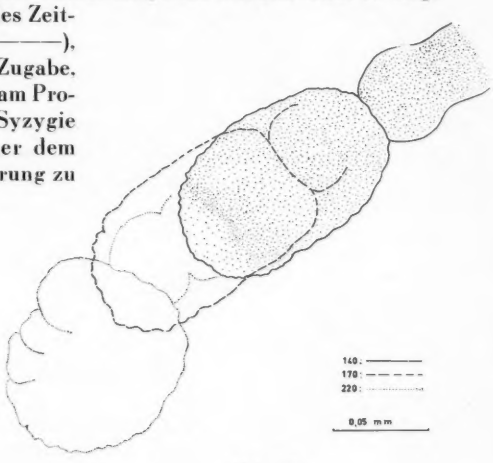


Abb. 40.

Abb. 39. *Gregarina polymorpha.* ATP 10^{-3} M. Einziehen des Protomeriten. (Aus der Teilbildanalyse.)

Abb. 40. ATP 10^{-3} M. Abkugeln des Primiten durch Einziehen. Von Teilbild 165 an beginnt der nahezu kugelige Primit sich einseitig zu kontrahieren (Teilbildanalyse).

sehen. Man hatte bis zu diesem Zeitpunkt von dieser Syzygie nicht den Eindruck, daß sie zur Encystierung komme, sie zeigte keine Gallerteabscheidung. Nach 1,5 Minuten (— — — —) ist die Kontur wieder nahezu

glatt, doch die Form des Protomeriten noch gedrungener als vorher. Die Welle am Anfang des Deutomeriten hat sich sogar verdoppelt.

Nach weiteren 3 Minuten ist der Protomerit auf weniger als ein Drittel seiner ursprünglichen Länge reduziert. Die Kontraktionen schreiten am Deutomeriten von vorn nach hinten weiter und zwar auf der linken Seite des Tieres stärker als auf der rechten. Der Satellit, der hier zum Teil noch abgebildet ist, zeigt keinerlei Veränderungen. In der nächsten Abbildung (Abb. 40) kann das Verhalten des gleichen Tieres weiter verfolgt werden. In Teilbild 140 ist eine Abgrenzung zwischen Proto- und Deutomerit nicht mehr zu erkennen. Die unterschiedliche Dichte des Plasma deutet nicht etwa diese Grenze noch an, sondern es handelt sich hier um

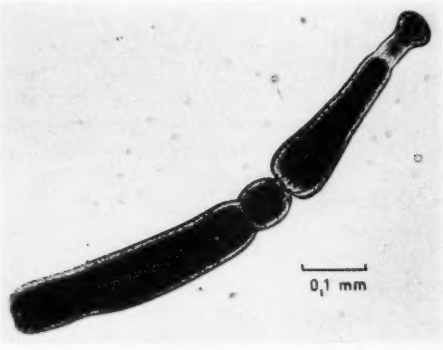


Abb. 41.

Abb. 42.

Abb. 41. *Gregarina cuneata*. Salyrgan 10^{-2} M. Heller Saum an der Pellicula wird sichtbar. Im Gegensatz zu ATP bleibt die Granuladichte gleichmäßig.

Abb. 42. *Gregarina cuneata*. Salyrgan 10^{-3} M. Veränderungen des Satelliten durch Nachlassen des Innendruckes oder der Pelliculaelastizität.

ein Zurückweichen des Plasma, wie es in den vorher geschilderten ATP-Versuchen stärker und schneller auftrat. Die Kontraktionen haben inzwischen den ganzen Deutomeriten erfaßt, das ganze Tier ist erheblich kürzer geworden. Im Teilbild 170 ist wieder eine stärkere Kontraktion an der rechten Seite des Primiten zu beobachten, die aber bald wieder verschwindet. Kurz darauf kontrahiert sich die gesamte linke Seite sehr kräftig, aber ebenfalls nur kurze Zeit. Das wechselt noch mehrmals (Teilbild 220 .....), wobei auch der Satellit in Mitleidenschaft gezogen wird: er beteiligt sich aber nicht aktiv an dem ganzen Vorgang.

Nach insgesamt 30 Minuten hat der Primit eine vollkommene Kugelgestalt angenommen und führt keine Bewegung mehr aus.

Eine weitere Verringerung der ATP-Konzentration auf 10^{-4} und 10^{-3} führte in der üblichen Beobachtungszeit zu keinen sichtbaren Veränderungen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Granulabewegung unter dem Ein-

fluß von ATP lebhafter wird, jedenfalls gewinnt man diesen Eindruck aus dem Zeitrafferlaufbild. Um hier zu Messungen zu gelangen, sollen diese Versuche später mit zentrifugierten Tieren wiederholt werden.

Da organische Quecksilberverbindungen die Spaltung von ATP hemmen (Kuschinsky und Turba 1950), wurde in weiteren Versuchen Salyrgan angewandt, und zwar in einer Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung auf $1 . 10^{-2}$ M bis $1 . 10^{-4}$ M. Bei Anwendung der 10^{-2} molaren Lösung war schon nach kürzester Zeit keine Bewegung mehr festzustellen. Diese Wirkung trat bei einer 10^{-3} molaren Salyrganlösung einwandfrei später auf. In beiden Versuchsreihen wiesen die Tiere wieder einen hellen Saum am Innenrand der Pellicula auf (Abb. 41), wie er auch in den ATP-Versuchen immer auftrat, jedoch zeigte das Protoplasma nicht die ungleichmäßige Dichte der Granula wie in den entsprechenden ATP-Versuchen. Verschiedentlich traten in der 10^{-3} M Salyrganlösung Veränderungen an den Tieren auf, wie sie Abb. 42 darstellt. Da nach Roskin und Levinson (1929) die Myoneme der Gregarinen eine wesentliche Stützfunktion ausüben, ist es denkbar, daß hier ein der Wirkung von Salyrgan auf eine Muskelzelle vergleichbarer Vorgang abläuft: Durch die Hemmung der ATP-Spaltung und Anhäufung des ungespaltenen ATP tritt der sogenannte „Weichmachereffekt" auf. Eine Verformung und erhöhte Plastizität ist an dem abgebildeten Tier zu erkennen. Wie schon erwähnt, bewegten sich die Tiere nach kurzer Zeit nicht mehr.

Ein Einfluß der nächsten Verdünnungsstufe 10^{-4} M war nicht mit Sicherheit zu beobachten. Ob hier ebenfalls noch die Bewegung gehemmt wurde, läßt sich bei dem Charakter der Gleitbewegung nicht einwandfrei sagen. Der helle Saum war auch in diesen Präparaten teilweise noch zu beobachten.

4. Mechanischer Reiz

Die Versuche mit dem Mikromanipulator (Leitz) ermöglichten auch einige Beobachtungen zur mechanischen Reizbarkeit der Gregarinen. Der von den Glaskapillaren auf die Tiere ausgeübte Druck hinterließ keinen Einfluß auf die Bewegungsfähigkeit. In dem Abschnitt „Strömung an der Gregarine" wurde auf die Schwierigkeit hingewiesen, die bei dem Festlegen der Gregarinen mit Hilfe zweier Glasnadeln auftrat; selbst unter starkem Druck (vergleiche Abb. 30 *a—c*) vermochten die Tiere, sich noch unter der Nadel hervorzuschieben. Aber auch jene, die längere Zeit den Druck ausgehalten hatten, setzten sich nach Anheben der Nadeln sofort wieder in Bewegung. Dabei waren oft nach Stunden noch die Druckstellen an der Pellicula zu erkennen.

Zur Prüfung der Frage, ob beide Syzygienpartner an der Bewegung beteiligt sind, sollten Primit und Satellit durch Auseinanderziehen getrennt werden. Die Trennung der Partner gelingt verschieden leicht. Ein Ausfließen des Plasmas an der Anheftungsstelle ist nie zu beobachten. Der Protomerit des Satelliten weist immer einen mehr oder weniger kleinen „Ringwall" auf, der die Anheftungsfläche zwischen den Tieren vergrößert. Eine Bewegung der getrennten Syzygienpartner wurde in kei-

nem Fall beobachtet. Daß hier beide Tiere von dem Insult betroffen sind, geht aus der Tatsache hervor, daß nach dem Anstechen eines Syzygienpartners der andere noch zur Bewegung fähig ist (siehe Abb. 33).

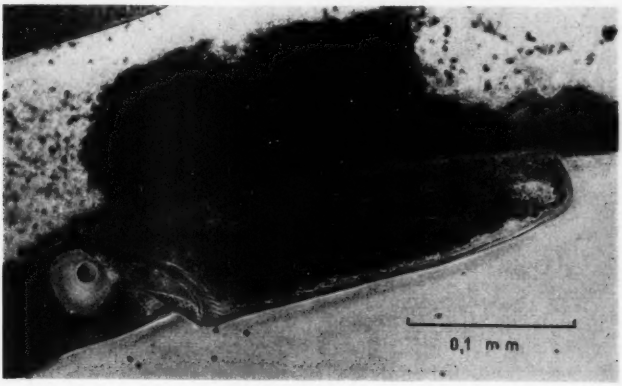


Abb. 43. *Gregarina cuneata.* Mit einer Mikronadel angestochenes Tier. Die Verletzung schloß sich, ehe das Plasma vollständig auslaufen konnte. Keine Bewegung.

Ist die durch das Anstechen verursachte Verletzung geringfügig, so daß sich die Wunde schließen kann, bevor eine größere Menge Plasma ausge-

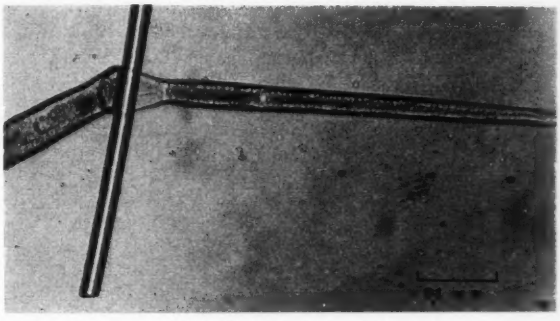


Abb. 44. *Gregarina polymorpha.* Dehnbarkeit der Pellicula auf das Drei- bis Vierfache der normalen Länge. Die zweite Nadel wurde nach rechts aus dem Bildfeld bewegt.

laufen ist, dann bewegt sich das verletzte Tier trotzdem nicht mehr (Abb. 43). Dembrowski (1913) berichtet, daß er die Bewegung der Teilstücke einer zerschnittenen Gregarine beobachtet habe, jedoch nur dann, wenn die Schnittstelle sofort verklebte.

In Abb. 44 läßt sich sehr gut die Elastizität der Pellicula zeigen. Die Syzygie wurde mit zwei Nadeln festgelegt und die eine Nadel bei gleich-

bleibendem Druck auf das Tier aus dem Bildfeld geführt. Der abgebildete Satellit ist auf das Drei- bis Vierfache seiner ursprünglichen Länge ausgezogen. Nach Anheben der beiden Nadeln setzte das Tier seine Gleitbewegung fort.

VIII. Zur Theorie der Bewegung polycystider Gregarinen

Zum Verständnis der Ergebnisse dieser Untersuchung werden zunächst einige morphologische Daten der *Gregarina cuneata* Stein und *Gregarina polymorpha* Hammerschmidt gegeben.

Der Körper ist drehrund, nach vorn und hinten leicht zugespitzt. Die Gestalt des Tieres wird durch eine Pellicula, die als elastische Membran das Protoplasma umgibt, erhalten. Jede Deformation dieser Gestalt, sei es durch Druck oder Zug von außen oder als Folge der Eigenbewegung, wird durch die Elastizität mehr oder weniger schnell wieder ausgeglichen. Daß die Eigengestalt des Tieres nicht sofort nach Beendigung der einwirkenden Kräfte wieder erreicht wird, liegt an dem Stützsystem, das diesen Sporozoen eigentümlich ist. Die Pellicula ist nicht glatt, sondern weist in Längsrichtung verlaufende Leisten auf, die die Stabilität der Gestalt wesentlich unterstützen, aber auch die Reaktionsgeschwindigkeit der elastischen Membran abbremsen. Es ist bekannt, daß die Tiere ein gut ausgebildetes System von Myonemen haben, das ebenfalls zur Erhaltung der Gestalt beiträgt (Roskin und Levinson, 1929). In der Regel kommen Längs- und Ringmyoneme vor. Für die hier untersuchten Gregarinenarten sind Längsmyoneme mit Sicherheit nachgewiesen; die Anwesenheit einer Ringfaserschicht scheint weniger sicher zu sein. Die kontraktilen Elemente liegen der Pellicula von innen dicht an. Unbekannt ist, ob die Längsmyoneme durch besondere Plasmastrukturen mit den der Pellicula aufsitzenden Leisten direkt in Verbindung treten. Abbildungen der Pellicula anderer Protozoen lassen im Querschnitt solche Differenzierungen erkennen (Fibrillen von *Euglena ehrenbergi* im Lehrbuch der Protozoenkunde, Doflein-Reichenow, 1949). Ein Querschnitt durch eine *Gregarina polymorpha* ist etwa so vorzustellen, wie es Abb. 43 schematisch zeigt. Es ist dabei unwesentlich, ob das Tier, wenn es auf einer Unterlage aufliegt, im Schnitt kreisrund oder an der physiologischen Unterseite leicht abgeplattet ist. Auch die Anzahl und die Form der Pelliculaleisten ist hier willkürlich gewählt; wichtig ist, daß das Tier mit diesen Leisten auf dem Objektträger aufliegt.

Die hier gegebene Hypothese geht von dieser Tatsache aus und nimmt an, daß von diesen Berührungsstellen des Tieres mit der Unterlage Reize zu den Längsmyonemen gelangen, die über diesen Leisten liegen. Auf Grund dieser Reize kontrahieren sich nur die Längsmyoneme, die bei der gerade vorliegenden Bewegungsphase der physiologischen Unterseite des Tieres angehören. In Abb. 43 wurde daher die Schicht der Myoneme nicht kompakt dargestellt, sondern jeweils ein „Bündel" einer Pelliculaleiste zugeordnet. Roskin (1929) stellte fest, daß die Längsmyoneme auf seinen Schnittpräparaten (Querschnitt) punktförmig

waren und noch innerhalb der Pellicula lagen. Hier sollen nachfolgende Untersuchungen ansetzen, um die morphologischen Verhältnisse sowohl der „Myonemschicht" als auch der „Pelliculastruktur" (siehe oben) zu klären. Die Kontraktionen würden ohne Wirkung auf die Ortsveränderung des Tieres bleiben, wenn nicht die klebrige Beschaffenheit der Pellicula eine ausreichende Haftung an der Unterlage gewährleiste.

Die Kontraktionen der Myoneme verlaufen von vorn nach hinten, und zwar folgen eine Anzahl „Kontraktionswellen" dicht aufeinander. Das Tier gleitet wie auf Kufen über die Unterlage. Laufen die Wellen aus, geschieht dies nicht plötzlich. Die Intensität der Kontraktionswellen läßt nach, und die Dichte der aufeinanderfolgenden Wellen nimmt ab. Eine „nachfolgende" Welle bewegt die Gregarine, die jetzt schon einmal kurze Zeit stillstand, noch ein Stückchen weiter, und dasselbe geschieht noch ein- bis zweimal. Es sei daran erinnert, daß eine „Ruhepause" während der Gleitbewegung in Wirklichkeit aus mehreren Vor-, einer Haupt- und schließlich einigen Nachpausen besteht, die sich auf die oben geschilderte Art erklären ließen.

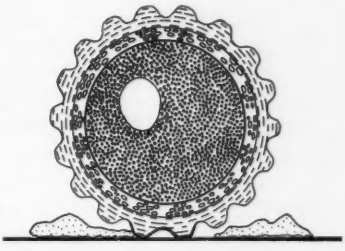


Abb. 43. Schematischer Querschnitt durch eine Gregarine. Links und rechts sind Kaolinteilchen angedeutet (Erklärung im Text).

Bewegen sich die Gregarinen derart in einem mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellten Präparat, so wird es, da die Tiere meist fast völlig undurchsichtig sind, verständlich, daß der Beobachter von den Kontraktionen normalerweise nichts sehen kann (vgl. Abb. 43). Sowohl Crawley (1902) als auch Mühl (1921) behaupten, unter Anwendung mikroskopischer Kunstgriffe, wie Schrägstellung des Kondensors (schiefe Beleuchtung), diese Kontraktionen schon gesehen zu haben.

Mit Hilfe des Prismenrotators (W. und H. Seibert), für durchfallendes Licht abgeändert nach Kuhl, wurde versucht, gleichzeitig die Unterseite des Präparates zu beleuchten und zu beobachten. Die Verlängerung des optischen Weges erlaubte dabei nur noch schwächste Vergrößerungen, so daß die feinen Kontraktionen auf diese Weise leider nicht festgestellt werden konnten.

Es sei noch einmal auf das Schema Abb. 43 hingewiesen, insbesondere auf die rechts und links des „Gregarinen-Querschnitts" angeordneten „Kaolinpartikel". Das rechte Teilchen liegt zwar dicht an dem Tier, steht aber nicht in Berührung mit den die Kontraktionen der Myoneme übertragenden Pelliculaleisten. Nur das Kaolinteilchen links wird an der sich bewegenden Gregarine entlang gleiten. So läßt sich auf einfache Weise die Tatsache erklären, daß in den Präparaten manche Partikel in Bewegung, andere, die ebenfalls scheinbar das Tier berührten, auf der Stelle verharren können.

Die Beobachtung der Gregarinen im natürlichen Medium (Darmschleim)

und das Hinzufügen einer Kochsalzlösung führte ja dazu, daß die „aktive" Bewegung eingestellt wurde, die Tiere sich streckten und sich nunmehr gleitend weiterbewegten. Da die hier vorgetragene Hypothese davon ausgeht, daß nur die Myoneme sich kontrahieren, die durch entsprechende Reize dazu veranlaßt werden, ist dieses Verhalten etwa folgendermaßen zu erklären:

Die zähe Substanz des Darminhaltes einer Tenebriolarve (Wirtstier) übt auf die gesamte Oberfläche der Gregarine den Reiz aus, der zur Myonemkontraktion notwendig ist, und wie er im dünnflüssigen Präparat nur von der Unterlage ausgeübt wird. Das ruckartige Strecken der Tiere, wenn sie die Grenze Schleim — Wasser durchbrochen haben, erfolgt durch den plötzlichen Übergang der jetzt nicht mehr gereizten Myoneme in ihren normalen Spannungszustand. Der Versuch, diesen Vorgang durch osmotische Veränderungen in den Tieren zu erklären, scheitert schon an dem Gegenexperiment zu den geschilderten Beobachtungen; es gelang darin, Gregarinen, die sich in physiologischer Kochsalzlösung gleitend bewegten, durch Hinzufügen einer quellbaren Substanz, zur „aktiven" Bewegung zu bringen. Hierdurch wird eine Verbindung zwischen den beiden Bewegungsarten der Gregarinen aufgezeigt. Es liegt auf Grund dieser Versuche nur eine Bewegungsform vor, deren Ausmaß je nach der Größe des Reizes verschieden stark ist.

Es wurde bereits verschiedentlich darauf hingewiesen, aus welchen Gründen die „Theorie" der „Bewegung durch Schleimsekretion" zumindest für Arten der Gattung Gregarina nicht zutrifft. Es seien die Tatsachen, die dagegen sprechen, noch einmal kurz aufgeführt.

1. Hängen zwei oder mehr Gregarinen an einem Schleimpfropf, können sie sich nicht voneinander entfernen (Abb. 3). Das sollte man aber nach der Sokolowschen Hypothese (1912) erwarten können. 2. Der produzierte Schleim müßte sich, bis er an das Hinterende gelangt, aufgelöst haben, da hinter dem Tier keine Schleimzunahme festzustellen ist (der Abstand nachgeschleppter Partikel vom Hinterende der Gregarine bleibt unverändert). 3. Der Schleim dürfte nur in einer Richtung quellen (anisotroper Schleim), sofern der Quellungsdruck die vorantreibende Kraft sein soll. 4. Das geradlinige Hervorgleiten der unter erheblichem Druck der Mikromanipulatornadeln befindlichen Tiere (Abb. 30) ist mit der Abscheidung von Schleim nicht zu erklären. Eine „aktive" Bewegung im Sinne der älteren Autoren kann es nicht sein, da keine Kontraktionen zu sehen sind. 5. Ein wesentliches Argument der Sokolowschen Theorie (1912) der Gregarinenbewegung stellen die Ergebnisse seiner Versuche mit Säuren dar. Es wird von dem Autor angenommen, daß die Gleitbewegung eingestellt wird, da die Tiere im sauren Medium nicht mehr in der Lage seien, Schleim zu produzieren; die Gleitbewegung werde durch die „aktive" Bewegung ersetzt.

Es konnte jedoch gezeigt werden, daß der Übergang von der Gleitbewegung zur „aktiven" Bewegung weder plötzlich erfolgt noch

beide Bewegungsarten durch eine bewegungslose Phase getrennt sind. Der Übergang ist in allen Phasen aufzufinden. Ein von saurem Medium ausgehender Reiz führt zur Kontraktion weiterer Myoneme, die jetzt aber nicht mehr der physiologischen Unterseite angehören, sondern seitlich davon liegen. Das Ergebnis sind die Krümmungen. Gleichzeitig steigt die Intensität der Kontraktionsbewegungen.

Eine Beeinflussung der klebrigen Beschaffenheit der Körperoberfläche hinderte die Tiere sofort an der fortschreitenden Bewegung, da die Haftung an dem Untergrund offenbar nicht mehr möglich war. Das bestätigt die Notwendigkeit der Annahme, die klebrige Pellicula als einen wichtigen Faktor für die Bewegung der Gregarinen anzusehen.

6. Ein wesentliches Merkmal der Gleitbewegung, der Wechsel zwischen steter Bewegung und Ruhepause wäre unter Umständen auch mit der Hypothese der Sekretion zu erklären. Daß aber eine Ruhepause in Wirklichkeit aus einer ganzen Reihe bewegungsloser Phasen, den Vor-, einer Haupt- und den Nachpausen zusammengesetzt ist, erschwert für die Sekretionshypothese die Erklärung. 7. Dasselbe gilt für die Tatsache, daß die Einhaltung einer bestimmten Bahn eine Folge der Körperform der Gregarinen ist. Eine Wirkung der Körperform auf die Bahn über den abgeschiedenen Schleim ist schwer vorzustellen. Die Krümmung der Bahn läßt sich zwar mit einer einseitigen Gallerteabscheidung ebenfalls erreichen; es müßte in diesem Falle jedoch die Geschwindigkeit der Tiere, die sich in einem Kreisbogen bewegen, deutlich langsamer sein gegenüber den sich geradlinig bewegenden.

Die Hypothese der Gregarinenbewegung nur durch Myonemkontraktionen baut sich aber nicht lediglich darauf auf, daß eine Anzahl von Ergebnissen mit Hilfe der Sekretionshypothese nur schwer oder gar nicht zu erklären ist, sondern sie wird auf der einwandfrei bewiesenen Tatsache, daß Kontraktionswellen unter besonderen Umständen während der Gleitbewegung vorhanden sind, aufgestellt. Infolge der Belastung mit zähem Schleim müssen eine größere Zahl von Myonemen zu Kontraktionen gereizt werden, um den Widerstand zu überwinden. Auch die Kontraktionswellen an der Unterseite werden intensiver und setzen jetzt schon vorne am Protomeriten an. Dadurch werden die auf der Unterseite verlaufenden Wellen zum erstenmal sichtbar.

Wenn die Geschwindigkeit der am seitlichen Rand des Tieres erkennbaren Wellen hinter der des Tieres zurückbleibt, so spricht das nicht gegen die Hypothese der Kontraktionswellen als Ursache der Bewegung. In diesem Sonderfalle tragen die zusätzlich gereizten Anteile der Myonemschicht nicht zu der Bewegung des Tieres bei. Der Reiz, der sie zur Kontraktion bringt, ist auch ein anderer (Zug oder Druck) als der, der zur „Bewegungskontraktion" führt. Eine verschiedene Reaktionsgeschwindigkeit in benachbarten Bezirken der Myonemschicht ist denkbar.

Es läßt sich demnach folgendes zusammenfassen:

Die Bewegung der hier untersuchten Arten der Gattung Gregarina mit Hilfe von Kontraktionswellen, die an der Unterseite verlaufen, ist sicher-

gestellt. Der Übergang von der gleitenden Bewegung zum „Winden" durch Beteiligung weiterer Myoneme an den Kontraktionen ist die einfachste Erklärung für die scheinbar vorhandene Fähigkeit zu zwei gänzlich verschiedenen Bewegungsarten. Hypothetisch bleibt noch die Zuordnung einzelner Myonempartien zu jeder Längsrippe der Pellicula, die Möglichkeit, daß nur einzelne Myoneme gereizt werden sowie die Beschränkung der Kontraktionen auf einzelne Pelliculaleisten.

Zur unterschiedlichen Auffassung der einzelnen Autoren der Bewegungsursache der Gregarinen mag die Tatsache beigetragen haben, daß die Tiere in der Lage sind, eine gallertige Substanz abzuscheiden. Es konnte gezeigt werden, daß dies bereits einige Zeit, bevor die ersten sichtbaren Kontrakttionen des Primiten die Phase des Einrollens zur Cyste einleiten, geschieht. Es ist durchaus denkbar, daß, wenn die Untersuchungen zufällig nur zur Zeit der Bildung zahlreicher Cysten (Frühjahr und Herbst) stattfinden, eine in Wirklichkeit nicht vorhandene Korrelation zwischen Gallerteausscheidung und Fortbewegung vermutet wurde.

Die weiteren physiologischen Versuche, insbesondere die einer Beeinflussung der Bewegung durch chemische Substanzen, stecken noch zu sehr in den Anfängen, als daß hier schon über exakte Ergebnisse berichtet werden könnte. Nur soviel sei gesagt, daß Stoffe wie ATP und Salyrgan Reaktionen auslösen. Inwieweit diese Reaktionen mit den Ergebnissen der Untersuchungen zur Muskelkontraktion übereinstimmen, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

IX. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die Bewegungsphysiologie von *Gregarina polymorpha* Hammerschmidt und *Gregarina cuneata* Stein wurde mit Hilfe des Zeitrafferfilmes (Änderung des Zeitfaktors), der Teilbildanalyse und des Mikromanipulators untersucht.

2. Beide Arten zeigen in ihrem bewegungs- und reizphysiologischen Verhalten keine Unterschiede.

3. „Aktive" Bewegung wurde nur im zähen Darmschleim des Wirtstieres beobachtet; in 0,8%iger Kochsalzlösung bewegten sich die Tiere gleitend. Durch Verdünnung des zähen Darmschleimes und Erhöhung der Viskosität der Kochsalzlösung durch quellende Mittel, lassen sich beide Bewegungsarten ineinander überführen. Die Art der Bewegung hängt von der Konsistenz des Medium ab.

4. Örtlich begrenzte Kontraktionen führen zu Knickbewegungen; das Einknicken erfolgt langsam, die Streckung ruckartig.

5. Die Cystenbildung wird stets durch Krümmungsbewegungen eingeleitet. Am Hinterende in Fäden ausgeschiedene Gallerte verhindert zusammen mit dem richtungslosen Winden und der nachfolgenden Rotation einen zufälligen Einschluß von Fremdpartikel in die Cyste.

6. Der von den Gregarinen regelmäßig mitgeschleppte Schleim ist ein Produkt des Wirtstieres.

7. Das wesentliche Merkmal der Gleitbewegung ist der Wechsel zwischen Bewegung und Stillstand. Die Teilbildanalyse von Zeitrafferaufnahmen ergibt, daß die scheinbar „bewegungslose Phase" aus mehreren kurzen „Vor"-, einer langen „Haupt"- und einigen kurzen „Nach"pausen besteht.

8. Die Bahn während der Gleitbewegung ist abhängig von der jeweiligen Körperform des Tieres.

9. Reizphysiologische Untersuchungen: Temperaturen über 29° C führen zum Absterben der Gamonten. ATP und Salyrgan lösen spezifische Reaktionen aus. Mechanischen Einflüssen gegenüber sind die Tiere sehr widerstandsfähig. Allen reizphysiologischen Untersuchungen stellt sich die außerordentlich geringe Reaktionsbreite der Gregarinen hemmend in den Weg.

10. Untersuchungen über den Einfluß saurer Medien mit definiertem pH-Wert zeigen, daß die Gleitbewegung langsam von einer Krümmungsbewegung überlagert wird und schließlich zu einem „Rundkriechen" führt.

11. Auch unter Zeitraffung wurde eine deutliche Strömung im Protoplasma nicht erkennbar. Innerhalb kleiner Areale liegt wahrscheinlich eine geordnete Bewegung der Granulen vor.

12. In Versuchen mit fein verteiltem Kaolin werden nur solche Partikel an den mit Hilfe des Mikromanipulators festgelegten Gregarinen entlang bewegt, die die Tiere berühren. Die Kaolinteilchen werden nur von vorn nach hinten befördert.

13. Einige Syzygien, durch anhängenden „Ballast" in der Gleitbewegung behindert, zeigen eine wellenförmige Veränderung der Pellicula.

14. Im Mikrozeitrafferlaufbild sind während der Gleitbewegung Kontraktionswellen an der Unterseite des Protomeriten zu beobachten.

15. Eine Einteilung der Gregarinenbewegung in eine „aktive" und „passive" ist nicht zulässig. Es ist vielmehr zwischen einer Bewegung mit sichtbaren und einer mit subjektiv nicht sichtbaren Myonemkontraktionen zu unterscheiden. Der Ausdruck „aktiv" kann für die Bewegung mit sichtbaren Myonemkontraktionen benutzt werden, sofern er nicht in Gegensatz zu passiv gestellt wird.

16. Es wird die Hypothese aufgestellt, daß je nach Art und Intensität des Reizes nur die Myoneme der jeweiligen physiologischen Unterseite oder alle Myoneme sich kontrahieren. Es resultiert die oben genannte verschiedene Art der Bewegung.

Literatur

Beneden, E. van, 1872: Note sur la structure des gregarines. Bull. Acad. Roy. Sci. Belg.

Berlin, H., 1924: Monocystideen in den Vesiculae der schwedischen Oligochaeten. Arch. Protistenk. *48*.

Berndt, A., 1902: Beitrag zur Kenntnis der im Darm der Larve von *Tenebrio molitor* lebenden Gregarinen. Arch. Protistenk. *1*.

Bütschli, O., 1881: Kleine Beiträge zur Kenntnis der Gregarinen. Z. wiss. Zool. *35*.

Crawley, H., 1902: The Progressive Movement of Gregarines. Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia *54*.

— 1905: The Movement of Gregarines. Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia *57*.

Daniels, M. J., 1938: A cytological study of the Gregarine Parasites of *Tenebrio*. Quart. J. Micr. Sci. *80*.

Dembrowsky, J., 1913: Versuche über die Merotomie der Gregarinen. Arch. Protistenk. *29*.

Doflein, F., und E. Reichenow, 1949: Lehrbuch der Protozoenkunde. Jena: Gustav-Fischer-Verlag.

Efimoff, A. u. W., 1925: Vitale Färbung und photodynamische Erscheinungen. Biochem. *155*.

Erhard, H.,: Methoden zur Untersuchung der Protoplasmabewegung und anderer primitiver Bewegungsarten. Abderhalden, Handbuch biol. Arbeitsmethoden, Abt. *V*, 2.

Göhre, E., 1943: Untersuchungen über den plasmatischen Feinbau der Gregarinen mit besonderer Berücksichtigung der Sexualitätsverhältnisse. Arch. Prot. *96*.

Goldacre and Lorch, 1950: Folding and unfolding of protein molecules in relation to cytoplasmic streaming, amoeboid movement and osmotic work. Nature *166*.

Grell, K. G., 1956: Protozoologie. Springer-Verlag.

Hartmann, M., 1933: Allgemeine Biologie. Stuttgart: Gustav-Fischer-Verlag.

— 1956: Die Sexualität. Stuttgart: Gustav-Fischer-Verlag.

Hoffmann-Berling, 1956: Biochim. Biophys. Acta *14*.

Käppner, W., 1958: Bewegungsphysiologische Untersuchungen an *Chaos chaos*. Protoplasma (im Druck).

Kaunat, H., 1953: Die Wirkung von Antibiotica auf *Paramaecium caudatum*. Protoplasma XLV.

Kuhl, W., 1937: Untersuchungen über das Verhalten künstlich getrennter Furchungszellen und Zellaggregate einiger Amphibienarten mit Hilfe des Zeitrafferfilmes (Laufbild und Teilbildanalyse). ROUX' Arch. *136*.

— 1942: Kinematische Zellforschung. Biol. gen. *16*.

— 1949: Neue Ergebnisse zur Cytodynamik der Befruchtung und Furchung des Eies von *Psammechinus miliaris* Gmel. Zool. Jahrb. *70*.

— 1949: Die technischen Grundlagen der kinematischen Zellforschung. Springer-Verlag.

— 1952: Vom Forschungsfilm zur Veröffentlichung. Mikroskopie *7*.

Kuschinsky und Turba, 1950: Über die Bedeutung der Sulfhydrylgruppen für Prozesse am Aktomyosin. Naturwiss. *37*.

Kriszat, G., 1950: Die Wirkung von ATP auf Amoeben. Ark. Zool. *1*.

Lamina, J.: Untersuchungen über den Einfluß der Ultrazentrifugierung auf den Bewegungs-, Teilungs- und Entwicklungsrhythmus des Eies von *Parascaris equorum* (Goeze) mit Hilfe des Zeitrafferfilmes. Protoplasma (im Druck).

Lühe, 1904: Bau und Entwicklung der Gregarinen. Arch. Protistenk. *4*.

Martiis, de, 1927: Sul miocito e sui movimenti delle Gregarine Monocystideen. Arch. Protistenk. *58*.

Michel, K., 1952: Eine neue mikrokinematographische Einrichtung. Z. wiss. Mikrosk. mikrosk. Techn. *60*.

Milojević, B., 1925: Zur Entwicklungsgeschichte der *Gregarina cuneata* (F. St.) mit besonderer Berücksichtigung der Entstehung des Geschlechtskerns. Arch. Protistenk. *50*.

Moriggi, M., 1943: Nuove gregarine policistidee parassite di carabidi italiana. Arch. Protistenk. *96*.

Moser, E., 1946: Untersuchungen zur Biologie und Bewegungsphysiologie einiger Monocystiden in verschiedenen Lebensphasen bei normalem Zeitmoment und unter Zeitraffung. Dissertation, Frankfurt a. M.

Mühl, D., 1921: Beitrag zur Kenntnis der Morphologie und Physiologie der Mehlwurm-Gregarinen. Arch. Protistenk. *43*.

Pähler, F., 1904: Über die Morphologie, Fortpflanzung und Entwicklung von *Gregarina ovata*. Arch. Protistenk. *4*.

Peterfi, T.: Mikrurgische Methodik. Abderhalden, Handbuch biol. Arbeitsmethoden, Abt. *V*, 2.

Prell, H., 1921: Zur Theorie der sekretorischen Ortsbewegung. II. Die Bewegung der Gregarinen. Arch. Protistenk. *42*.

Prowazek, S., 1902: Zur Entwicklung der Gregarine *Monocystis agilis*. Arch. Protistenk. *1*.

Roskin und Levinson, 1929: Die kontraktilen und Skelettelemente der Gregarinen. Arch. Protistenk. *66*.

Watson, M. E., 1916: Studies on Gregarines. Illinois Biological Monographs. Vol. *II*.

Weber, H. H., 1933: Kontraktile Proteine und Motilität der Lebewesen. Verh. Ges. dtsch. Naturf., Springer-Verlag.

Weber and Portzehl, 1954: The transference of the muscle energy in the contraction cycle. Progr. Biophys. Biophysical Chem. *4*.

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Cytologie tabakmosaikvirus-infizierter Tabakpflanzen

Von

W. Wehrmeyer

Aus dem Botanischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster in Westfalen

Mit 14 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. September 1958)

A. Untersuchung der Chloroplasten

Chloroplastenstudien an virusinfizierten Pflanzenzellen sind bereits in umfangreichem Maße erfolgt. Eine ungefähr 50 Arbeiten erfassende Literaturübersicht bis etwa 1945 bietet Cook (1947). Weitere wichtige Arbeiten finden sich in den Zusammenfassungen von Esau (1938 und 1948). Eingehende Angaben über die strukturellen Veränderungen der Plastiden TMV-infizierter Pflanzen sind in den älteren Arbeiten kaum zu finden; soweit bekannt, gehen Woods und Du Buy (1951) erstmals auf die Veränderungen der Grana ein. Die Chloroplastenarmut TMV- (Gelbstamm-) infizierter Gewebe und die Pigment- und Größenabnahme der Restplastiden sind immer wieder beobachtet (Petersen und McKinney 1938). Die Art der Zerstörung der Chloroplasten in den infizierten Geweben dagegen bleibt widerspruchsvoll. Angesichts der Abhängigkeit der Symptombildung vom Entwicklungszustand der Pflanze zum Zeitpunkt der Inokulation, von Licht, Temperatur und Ernährung und besonders vom Virusstamm ist es nicht verwunderlich, daß die cytologischen Befunde nicht völlig übereinstimmen und vielfach unsicher bleiben. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Untersuchungsmethode. „Lebenduntersuchungen" an abgerissenen Epidermen oder auch Dünnschnitten erwachsener Tabakblätter erweisen sich nach Zech (1952) als sehr fragwürdig. Die Veränderungen, denen die Chloroplasten bei dieser Präparation unterliegen, sind von vorsichtigen Untersuchern, wie Iwanowski (1903), Hoggan (1927) und Esau (1944), durchaus erkannt und erwähnt worden. Viele Arbeiten an fixiertem Material lassen infolge Verwendung unzulänglicher Fixiermittel eine Nachuntersuchung als wünschenswert erscheinen. Auf die Schwierig-

keiten einer strukturerhaltenden Fixation gerade der erwachsenen Plastiden ist erst in neuerer Zeit hingewiesen worden (Grave 1954).

Beschränkten sich die älteren cytologischen Untersuchungen darauf, die Virusschädigung der Zellorganellen zu erfassen, so tritt in den neueren Arbeiten darüber hinaus die Frage nach dem Ort der Virusvermehrung in der Zelle stärker hervor. Die ersten lichtmikroskopischen Plastidenuntersuchungen unter dieser Fragestellung führten Rischkov und Smirnova (1940), die ersten elektronenmikroskopischen Untersuchungen Kausche und Ruska (1940) durch. Die Entstehung von X-Körpern aus aggregierten, degenerierten Chloroplasten beobachtete Bald (1948) für das TMV, Koshimizu und Iizuka (1957) für zwei Papilionaceen-Viren. Black und Mitarb. (1950) untersuchten erstmalig Ultradünnschnitte TMV-infizierter Blattgewebe im Elektronenmikroskop. Ein benachbartes Auftreten von fibrillärem Virusmaterial und Chloroplasten wurde beobachtet und ein näherer Zusammenhang vermutet. Leyon (1953) arbeitete an isolierten Chloroplasten aus virusinfiziertem Blattgewebe des Rüben- und Tabakmosaikvirus. Die elektronenmikroskopischen Bilder von fibrillärem TMV in Kontakt mit Plastidenfragmenten deutet der Autor im Sinne einer Virusproduktion in den Chloroplasten. Skotland und Mitarb. (1955) untersuchten Ultradünnschnitte gesunder und TMV-infizierter Tabakpflanzen im Elektronenmikroskop. Nach ihnen trat das Virus bevorzugt an solchen Stellen auf, an denen die Plastiden nach erfolgter Zerstörung „ihre Grana und anderen Inhalt" ins Cytoplasma entlassen hatten. Brandes (1956) beobachtete in Ultradünnschnitten TMV-infizierter Blattgewebe zwar strukturell stark veränderte Chloroplasten, konnte aber weder innerhalb noch in unmittelbarer Nähe derselben eine Virusanhäufung nachweisen. Nach Brandes sind die Chloroplasten für die Virusvermehrung zumindest nicht notwendig. Auch Matsui (1956) fand auf Grund elektronenmikroskopischer Untersuchungen an TMV-infizierten Blättern die TMV-Partikeln innerhalb der infizierten Zellen ohne Beziehung zu den zerstörten Chloroplasten.

Angesichts dieser Unsicherheit unserer Kenntnisse sollten die eigenen Untersuchungen zur Klärung zweier Fragen beitragen:

1. Inwieweit führt die TMV-Vermehrung in Blattgeweben zu pathologischen Veränderungen der Chloroplasten in diesen Geweben und wie verläuft die eventuelle Störung oder Zerstörung bei sorgfältiger lichtmikroskopischer Vitalanalyse?

2. Lassen sich auftretende Chloroplastenschäden im Elektronenmikroskop näher analysieren, oder sind bei Mangel lichtmikroskopisch sichtbarer Veränderungen Chloroplastenschäden im sublichtmikroskopischen Bereich zu erfassen?

Lichtmikroskopische Untersuchung der Chloroplasten

Da die methodischen Grundlagen zu der vorliegenden Untersuchung in einer anderen Veröffentlichung bereits ausführlich angegeben wurden (Wehrmeyer 1959), wird auf eine Wiederholung an dieser Stelle verzichtet. Es erfolgte die Frühinfektion des Tabaks im Keimlingsstadium mit

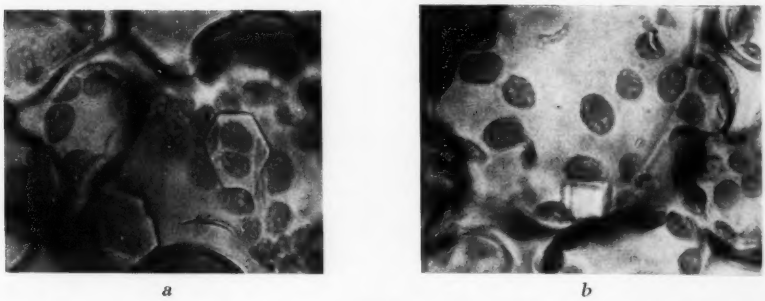
den TMV-Stämmen Vulgare, G 7 und G 2 (Köhler 1942). Die Vitaluntersuchung von Keim- und Folgeblättern erfolgte nach Wasserinfiltration ohne Anwendung störender Dünnschnittechnik. Die Beobachtung von Viruseinschlußkörpern einschließlich ihrer Entwicklung und von Chloroplasten ist möglich.

In der Zeit vom 1. Oktober 1956 bis zum 6. August 1957 wurden 27 Keimlingsinfektionsserien mit je 48 Virusinokulationen und je 16 Kontrollen in Pikierschalen durchgeführt. Dabei wurde nach entsprechenden Vorversuchen der raschwüchsige Samsuntabak mit 24 Serien bevorzugt bearbeitet. Es wurde in 14 Serien der Gelbstamm G 2 inokuliert, parallel dazu in 7 Serien TMV G 7, in 6 Serien TMV Vulgare. In den Keimblättern treten Viruseinschlußkörper in Form von Prismen (Abb. 1) nach drei, in Form von Schleifen (Abb. 3) nach etwa vier Tagen auf. In den zum Zeitpunkt der Inokulation noch nicht sichtbaren Folgeblättern ist der Virusnachweis erst erheblich später durchzuführen, da das Wachstum der Gesamtpflanze wie auch der Einzelorgane stark gehemmt ist. Frühestens nach 9—12 Tagen p. i. ist der Prismen- und Schleifennachweis in den ersten beiden Folgeblättern zu erbringen. Die Beobachtungsmöglichkeiten und die Menge der Einschlußkörper nehmen in etwas älteren Stadien zu. Als bemerkenswertes und überraschendes Ergebnis der Untersuchung ist die fehlende oder erst spät einsetzende Symptombildung in Form von Chlorophylldefekten an Keim- und frühen Folgeblättern nach der Infektion mit den drei TMV-Stämmen anzusehen. Beim Samsuntabak blieben die Keimblätter 15—25 Tage p. i. ohne äußere Symptome; die ersten Folgeblätter zeigten im Sommer bis 30 Tage p. i., im Winter bis 50 Tage p. i. keine Chlorophylldefekte, wobei die angegebenen Werte nicht als absolute Endpunkte zu betrachten sind. Licht und Temperatur können die Symptomausprägung auch in diesem Bereich beeinflussen, wie die unterschiedlichen Angaben für Sommer und Winter zeigen. Die im weiteren Verlauf der Entwicklung gebildeten Folgeblätter zeigen das von Spätinfektionen her gewohnte Bild unruhiger Mosaikscheckung, Hellgrün-Dunkelgrün bei TMV Vulgare und Gelbweiß-Grün bei den Gelbstämmen G 2 und G 7.

Durch die lichtmikroskopische Untersuchung der Keim- und frühen Folgeblätter keimlingsinfizierten Tabaks wurden die oben erwähnten, nur phänomenologischen Beobachtungen über fehlende Mosaikausprägung bestätigt und erweitert. Zur ständigen Kontrolluntersuchung wurden die stark reduzierten oder deformierten Sekundärblätter herangezogen; die Abbildungen (1 und 2) erfassen dagegen den Keimblattbereich, da die Bedingungen für die Mikrophotographie hier günstiger liegen. In fast allen Geweben (mit Ausnahme der Leitbündel) und je nach dem Untersuchungszeitpunkt in der überwiegenden Zahl der Zellen ist die Virusgegenwart in Form von Einschlußkörpern lichtmikroskopisch nachzuweisen; in den gleichen Zellen sind Chloroplasten in großer Zahl (wenige in der Epidermis) und ohne sichtbare Anzeichen einer Schädigung vorhanden (Abb. 1 *a* und *b*).

Reichlicher Stärkegehalt wurde in den Chloroplasten der virusinfizierten Gewebe häufig (Abb. 2 *a* und *b*), aber nicht regelmäßig und in gleicher Weise in völlig gesunden Kontrollen gefunden. Die Stärke ist mit J_2-KJ-Lösung ein-

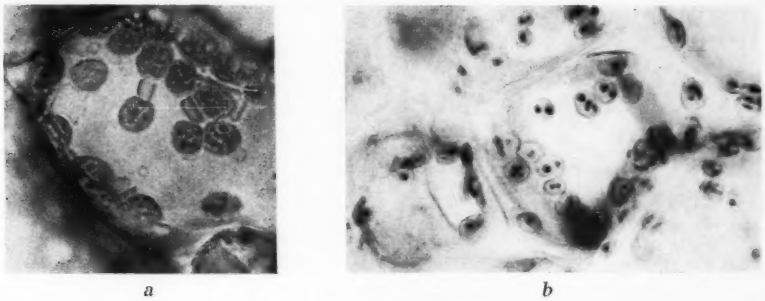
deutig mikrochemisch nachzuweisen (Abb. 2 *b*); eine Verwechselung mit den Grana der Plastiden ist nicht möglich. Sogenannte „Macrograna" im Sinne Woods und Du Buy (1951) wurden nicht festgestellt. Niemals wurden ferner bei einwandfreier Untersuchungsmethode in den angegebenen Geweben innerhalb der angegebenen Untersuchungszeit vakuolisierte Chloro-



a *b*

Abb. 1 *a* und *b*. Schleifen und hexagonale Prismen mit völlig intakten Chloroplasten vergesellschaftet im Keimblattmesophyll. Vergr. 730×.

plasten beobachtet, wie sie für ältere, systemisch virusinfizierte Folgeblätter verschiedentlich angegeben werden (Iwanowski 1903, Hoggan



a *b*

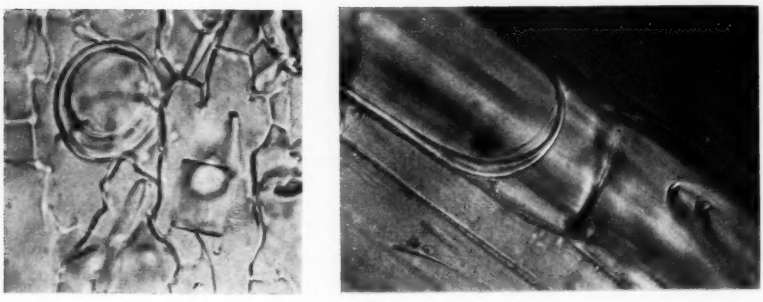
Abb. 2 *a* und *b*. Stärkehaltige Chloroplasten in virusinfizierten Zellen *a*: vital; *b*: nach positiver Reaktion mit J_2-KJ-Lösung. Vergr. *a* 825×, *b* 650×.

1927, Sorokin 1927, Dufrenoy 1930, Woods und Du Buy 1951). Unterschiedliche Plastidengrößen in ein und derselben Zelle kommen vor (Abb. 1 *b*), ohne daß weitere cytomorphologische Abweichungen auf eine Schädigung durch das Virus schließen lassen; auch sind ähnliche Verhältnisse in gesunden Kontrollpflanzen anzutreffen.

Fassen wir die Befunde an Keim- und frühen Folgeblättern und die Ergebnisse der Vitaluntersuchungen über das Vorkommen von Viruseinschlußkörpern in Wurzeln und Blüten (Wehrmeyer 1959) zusammen, so ergibt sich:

1. In den chloroplastenfreien Geweben der Blüte und der Wurzel treten die Viruseinschlußkörper in der gleichen Weise wie in den chloroplastenhaltigen Geweben auf (Abb. 3 *a* und *b*). In den Blüten ist sogar eine gesteigerte Virusproduktion die Regel. Die Befunde von White (1934) und Stanley (1938) über die Virusvermehrung in Wurzeln und von Holmes (1934) über die Nichtnotwendigkeit von Chlorophyll und Licht werden bestätigt.

2. In den chloroplastenreichen Geweben der Keimblätter erfolgt die Bildung der TMV-Einschlußkörper nach Keimlingsinfektion innerhalb von



a *b*

Abb. 3 *a* und *b*. Nachweis der Viruseinschlußkörperbildung (Schleifen) in den chloroplastenfreien Geweben *a* der Blüte und *b* der Wurzel. Vergr. 700×.

3—4 Tagen, in denen der frühen Folgeblätter bald nach ihrer Entwicklung (9—12 Tage) ohne irgendeine äußerlich oder lichtmikroskopisch sichtbare Schädigung oder Veränderung des Chloroplastenbestandes. Die Virusschädigung selbst ist dabei durch die erhebliche Wachstumshemmung im Vergleich zu den nichtinfizierten Kontrollpflanzen eindeutig; insbesondere sind die Sekundärblatt- und Seitenwurzelbildung stark beeinträchtigt. Die regelmäßige Vergesellschaftung von Viruseinschlußkörpern in Form von Prismen, Schleifen oder auch Fadenbündeln mit völlig intakten, häufig stärkehaltigen Chloroplasten zeigt eindeutig, daß die Vorgänge, die bis zur erfolgten Einschlußkörperbildung in der Wirtszelle ablaufen, die Chloroplasten in den genannten Bezirken cytomorphologisch nicht oder in nicht lichtmikroskopisch erfaßbarer Weise schädigen. Auch eine ansehnliche Zeitspanne über die Phase der Einschlußkörperbildung hinaus ändert sich an diesem Zustand der Chloroplasten nichts. Daß die Phase bis zur Einschlußkörperbildung die eigentliche virulente Phase der Virusvermehrung darstellt, ist mehrfach belegt (Holmes 1930, Steere 1952, Zech und Vogt-Köhne 1953 und 1956).

3. Alle lichtmikroskopisch beobachtbaren Entwicklungsprozesse von TMV-Einschlußkörpern (Prismen, Schleifen und Fadenbündeln) finden im Cytoplasma oder in X-Körpern statt, nie aber innerhalb oder auch nur in direkter Beziehung zu benachbarten Chloroplasten.

Elektronenmikroskopische Untersuchung der Chloroplasten

Material und Methode

Die elektronenmikroskopische Analyse der Chloroplasten virusinfizierter Blattgewebe macht entsprechende Kontrolluntersuchungen an gesunden Blattgeweben notwendig. Der vergleichenden Untersuchung stellte sich jedoch eine Schwierigkeit entgegen. Durch die Virusinfektion im Keimlingsstadium wird eine starke Wachstumshemmung in den infizierten Pflanzen ausgelöst, während die Kontrollpflanzen ungestört weiterwachsen. Gleichaltrige Pflanzen zeigen daher schon 10—14 Tage nach der Infektion so starke Größenunterschiede und stellen daher so unterschiedliche Fixationsbedingungen, daß an einer Paralleluntersuchung gleichaltriger Pflanzen unter konstanten Bedingungen nicht festgehalten werden konnte. Als Kontrollen wurden daher Sekundärblätter gesunder Tabakanzuchten vom Aussehen und Entwicklungszustand genommen, der dem der Sekundärblätter keimlingsinfizierter Tabakpflanzen entsprach. 20—30 Tage alte, gesunde Kontrollpflanzen weisen Sekundärblätter auf, die der Größe der Sekundärblätter etwa 40 Tage alter, keimlingsinfizierter Pflanzen entsprechen. Das Alter der Pflanzen zur Zeit der Inokulation betrug je nach der Jahreszeit 6—15 Tage vom Tag der Aussaat an gerechnet.

Die Behandlung von virusinfiziertem (TMV G 2) und gesundem Material (Samsuntabak) erfolgte in stets gleicher Weise: Die den Pikierschalen entnommenen Pflanzen wurden gesäubert, Keim- und Primärblätter und Teile der Wurzel verworfen. Der Sproß mit dem Sekundärblatt gelangte — meistens nach Wasserinfiltration und Kontrolle der Virusgegenwart — rasch in eine gepufferte Osmiumsäurelösung (1%ig, pH 7,2) zur Fixation. Fixationsdauer 2 Std., Wässern ¾—1½ Std. Uranylacetat-Kontrastierung nach Strugger (1956b), 1%ige Lösung in Aqua dest., 1½—2 Std., Wässern 1—2 Std. In Stichproben wurde an dieser Stelle der Erhaltungszustand lichtmikroskopisch kontrolliert. Im weiteren wurde nach der in der Elektronenmikroskopie üblichen Weise verfahren (Angaben siehe Wehrmeyer 1959).

Über die Struktur der erwachsenen Chloroplasten höherer Pflanzen liegen bereits ausgezeichnete Arbeiten vor (Steinmann und Sjöstrand 1955, Hodge und Mitarb. 1955, Strugger 1956a). Auch speziell über Tabakchloroplasten erschien eine Arbeit von Cohen und Bowler (1953), die jedoch an isolierten Chloroplasten durchgeführt wurde. Wenn auch im einzelnen, z. B. im Bau der Granen, Unterschiede zwischen den Chloroplasten verschiedener Herkunft bestehen mögen (Mühlethaler 1957), so liegt doch genügend gesichertes Material als Vergleichsgrundlage für eine Untersuchung pathologischer Plastidenformen vor. Die elektronenmikroskopische Untersuchung von virusinfizierten Blättern mit inhomogenem Plastidenbestand wird dadurch erschwert, daß die Chloroplasten methodischen Eingriffen, besonders der Fixation gegenüber, eine ungleiche Reaktion zeigen können; daher besteht fast immer die Gefahr einer ungleichen Ausprägung der präparationsbedingten Schäden, was zu einer Vergröberung der ursprünglichen Verhältnisse führt. Aus diesem Grunde ist es nicht ver-

wunderlich, daß geschädigte Chloroplasten aus virushaltigen Geweben leichter zu erhalten sind als ungeschädigte. Durch die Ergebnisse der licht-

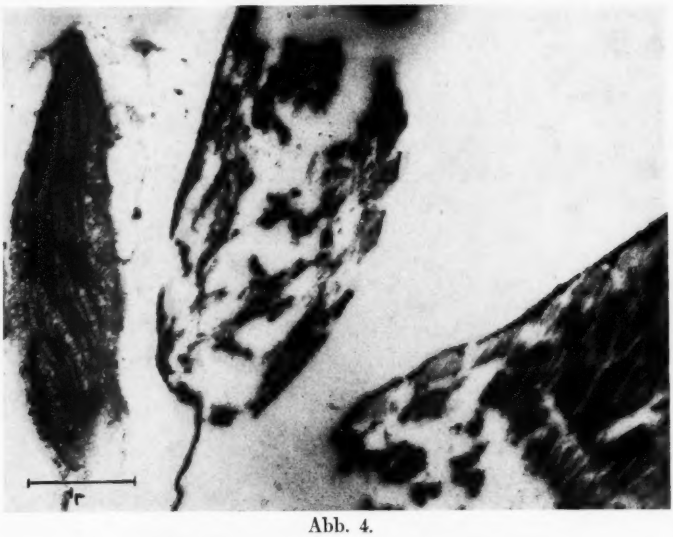


Abb. 4.

Abb. 5.

Abb. 4 und 5. Vergesellschaftung von längsseitig parallelgelagerten TMV-Partikeln (rechts unten) mit Chloroplasten unterschiedlichen Erhaltungszustandes aus dem Sekundärblattgewebe 41 Tage alter Tabakpflanzen, 26 Tage p. i. mit TMV G 2. (pr. 8800×), 14.960×.

mikroskopischen Vitalanalyse der Chloroplasten in virusinfizierten Folgeblättern aber ist eine Voraussetzung für die kritische Beurteilung der präparationsbedingten Plastidenschäden geschaffen.

Bei fast allen bisher durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen virusinfizierter Zellen wurde ferner zur kontrastreichen Darstellung der Viren die Schrägbedampfung der Ultradünnschnitte angewandt (Black und Mitarb. 1950, Smith 1953, Skotland und Mitarb. 1955, Brandes 1955 und 1956, Goldin und Fedotina 1956, Nixon 1956 b). Die zur Schrägbedampfung notwendige und unumgängliche Auflösung des

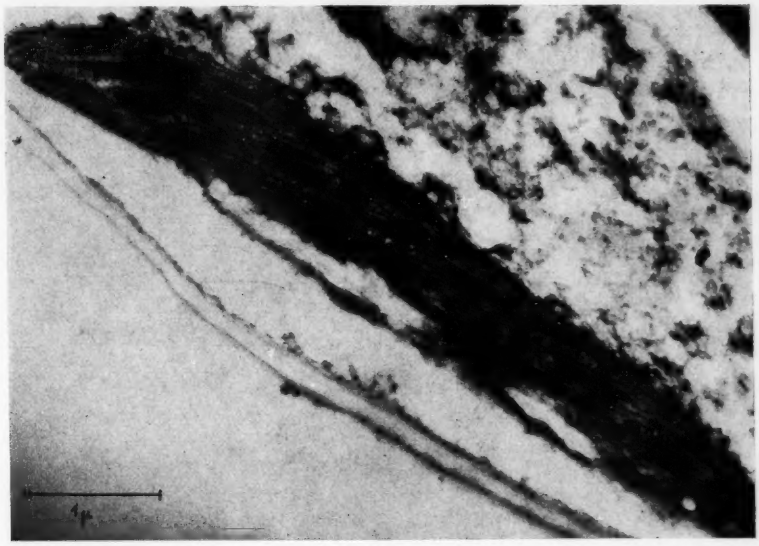


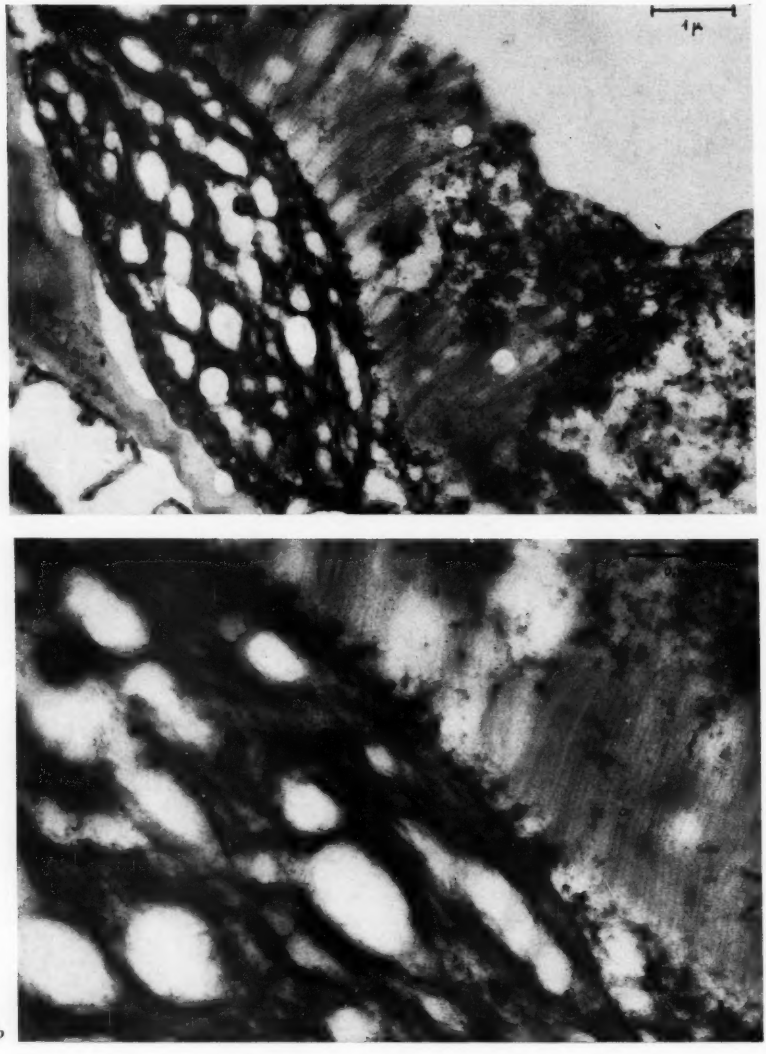
Abb. 6. Medianer Querschnitt durch einen gut erhaltenen Chloroplasten aus dem Sekundärblattgewebe 41 Tage alten Samsuntabaks, 26 Tage p. i. mit TMV G 2 (Länge 7,8 μ, Breite [max.] 0,8 μ, Granadurchmesser 0,3—0,6 μ mittlerer Granadurchmesser 0,4 μ, Granahöhe 33—230 mμ, Dicke der Stromalamellen 10—15 mμ); (pr. 8800×), 22.000×.

Einbettungsmittels ist jedoch ein kritischer Eingriff, der zu unkontrollierbaren Veränderungen des ursprünglichen Zustandes führen kann (Frey-Wyssling 1955 und Nixon 1956 a). Durch die Einführung der Kontrastierung mit Uranylacetat konnten die mit der Schrägbedampfung verbundenen methodischen Eingriffe vermieden werden.

Ergebnisse

1. Anzeichen einer Virusproduktion in den Chloroplasten der Sekundärblätter keimlingsinfizierter Tabakpflanzen in Form von TMV-Partikeln wurden in keinem Falle beobachtet. Eine Unterscheidung möglicher Untereinheiten (Vorstufen) des TMV von den „globulären" Stromaproteinen der Chloroplasten ist allerdings nicht durchführbar gewesen.

2. Es gibt keine eindeutigen Hinweise für eine nähere Beziehung des Virus zu den Chloroplasten einer Zelle. Räumliche Koexistenz von Virus



a

b

Abb. 7 *a* und *b*. Räumliche Koexistenz von Chloroplasten und fibrillärem TMV im Cytoplasma. Sekundärblattgewebe 40 Tage alten Samsuntabaks, 30 Tage p. i. mit TMV G 2. Kein Auswachsen der Virusfibrillen aus dem Chloroplasten; der Chloroplast ist vom Cytoplasma umhüllt. *a* (pr. 8000×), 13.600×; *b* (pr. 21.500×), 36.500×.

und Chloroplasten im Cytoplasma ist licht- und elektronenmikroskopisch erwiesen (Abb. 7 *a* und *b*).

3. Der Erhaltungszustand der Chloroplasten in virusinfizierten Zellen ist unterschiedlich und nur im Vergleich mit methodisch gleichartig behandelten, gesunden Kontrollen zu beurteilen. Die Chloroplasten können gut erhalten (Abb. 6) oder mehr oder weniger verändert sein, auch innerhalb einer Zelle (Abb. 4 und 5). Das Stärkevorkommen in den Chloroplasten führt zu Formveränderungen, die in Kontrollen und Virusmaterial gleiches

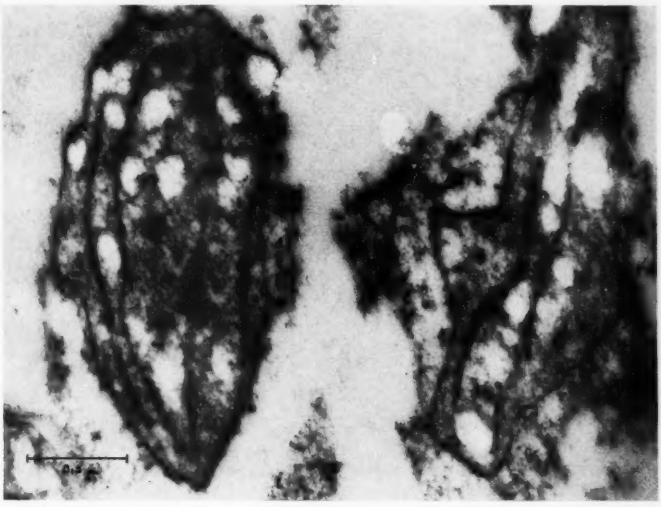


Abb. 8. Jungchloroplasten aus dem Sekundärblattgewebe 20 Tage alter, gesunder Tabakpflanzen. Das Stroma ist von einer geringen Anzahl Stromalamellen durchzogen; die Parallelität benachbarter Lamellen ist auffällig (pr. 21.500×), 32.200×.

Ausmaß zeigen. Die in den elektronenmikroskopischen Bildern hin und wieder sichtbar werdende Vakuolisation der Chloroplasten war lichtmikroskopisch nicht erfaßbar und ist nach Steinmann und Sjöstrand (1955) vermutlich präparationsbedingt. Sie wurde an gleichbehandelten Kontrollen ebenfalls festgestellt und nimmt mit dem Alter der Gewebe zu. Eine Deutung der Plastidenschäden im Sinne einer Virusvermehrung in oder in unmittelbarer Beziehung zu den Chloroplasten erscheint nicht begründet. Die Annahme einer indirekten Schädigung der Chloroplasten im Zuge der Virusinfektion findet in einer gesteigerten Fixationslabilität ihre Unterstützung.

4. Die nicht oder nur wenig geschädigten Chloroplasten virusinfizierter Zellen des Sekundärblattgewebes keimlingsinfizierter Tabakpflanzen entsprechen in ihrer Struktur durchaus den Chloroplasten gesunder Tabakpflanzen (Cohen und Bowler 1953) und anderer Angiospermen (Abb. 6).

5. Die in gesunden Sekundärblättern 20 Tage alter Samsuntabakpflanzen gefundenen Frühstadien der Chloroplastenentwicklung (Abb. 8) zeigen teilweise noch amöboid-formveränderliche Jungchloroplasten mit nur geringer Lamellenzahl im Stroma und einsetzender Sekundärgranabildung. Die bevorzugte Aufspaltung der Lamellen im prospektiven Granabereich ist deutlich sichtbar. Das Dickenwachstum der Sekundärgrana durch identische Reduplikation der Lamellen ist auch auf Grund der Befunde von Leyon und von Wettstein (1954), Mühlethaler (1955), Hodge und Mitarb. (1955) und Strugger und Perner (1956) anzunehmen. Die jüngsten, in Sekundärblättern keimlingsinfizierter Tabakpflanzen (36 Tage alt, 22 Tage p. i. mit TMV G 2, Samsuntabak) gefundenen Chloroplastenstadien zeichneten sich ebenfalls durch die geringe Größe und niedrige Zahl der Stromalamellen aus; die Sekundärgranabildung war aber bereits in allen Fällen, wenn auch in unterschiedlichem Maße, eingetreten.

Diskussion

Die Annahme einer Virusvermehrung in den Chloroplasten ist nur durch den methodisch einwandfrei geführten Nachweis des Virus in den Chloroplasten zu sichern. In welcher Form das Virus dabei auftritt, ist für die Frage nach dem Modus, nicht aber für die Frage nach der Lokalisation der Virusvermehrung von Bedeutung. Dieser Nachweis ist bisher in keiner Weise erbracht. Entscheidend für die Beurteilung der Befunde Leyons (Literatur siehe Einleitung) sind seine Ergebnisse an Chloroplastenfraktionen aus gesunden Geweben, denen gereinigte Viruslösung zugesetzt wurde: Im Elektronenmikroskop ergaben sich Bilder von virusumlagerten Chloroplastenfragmenten, die denen der Chloroplasten aus virushaltigen Geweben völlig entsprachen. Die sekundäre Anlagerung des Virus ist damit erwiesen, und die Diskussion seiner Befunde erübrigt sich. Aus der räumlichen Koexistenz von Virus und Chloroplasten im Ultradünnschnitt (Black und Mitarb. 1950) auf einen unmittelbaren Zusammenhang zu schließen, ist naheliegend, aber nicht ausreichend begründet. Die übrigen Arbeiten zeigen keine unmittelbare Beziehung des Virus zu den Chloroplasten (Brandes 1956 und Matsui 1956) oder nur nach ihrer restlosen Zerstörung (Bald 1948, Skotland und Mitarb. 1955). Auf Grund dieser Befunde und der eigenen Untersuchungen werden die unbestritten in vielen Fällen der TMV-Infektion auftretenden Chloroplastenschäden als unspezifische Sekundärerscheinungen der virusinfizierten Zellen gedeutet (Resühr 1942, Esau 1944 und 1948). Die Abhängigkeit der Mosaikausprägung vom Virusstamm und Infektionstermin und von der Jahreszeit (Licht, Temperatur und Ernährung) wird erneut unterstrichen. Literatur siehe Köhler und Klinkowski (1954).

Für den sekundären Charakter der Chloroplastenschäden im Keimlingsbereich spricht das späte Auftreten von Symptomen erhebliche Zeit nach der Viruseinschlußkörperbildung; die Nichtnotwendigkeit der Chloroplasten zur Virusvermehrung wird durch die ungestörte Virusproduktion in den chloroplastenfreien Geweben der Wurzel und der Blüte bewiesen.

B. Untersuchung des Cytoplasmas

Bei den bisherigen cytomorphologischen Untersuchungen virusinfizierter Pflanzenzellen hat das Cytoplasma nur wenig Beachtung gefunden. Beobachtet wurden die auffälligen, auch lichtmikroskopisch sichtbaren Veränderungen, die die Konfiguration, Form und Bewegung des Cytoplasmas betreffen. Mit der Virusinfektion der Zelle ist eine bemerkenswerte Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit, besonders in der Frühphase der Infektion, zu beobachten (Sheffield 1931, Zech 1952) und gleichzeitig eine weitgehende Aufteilung des Vakuolenraumes durch Cytoplasmastränge (Vakuolisierung des Cytoplasmas) (Dufrenoy 1930, Zech 1954). In den Spätinfektionsstadien ist eine eigenartig starre Plasmakonfiguration in den Zellen typisch (Zech 1954), die Brandes (1956) auf Grund elektronenmikroskopischer Aufnahmen mit einem gesteigerten Vorkommen von längsaggregiertem Virus in den Plasmasträngen in Zusammenhang bringt. Weitere Cytoplasmauntersuchungen stehen im Zusammenhang mit dem Vorkommen und der Bildung von Viruseinschlußkörpern. Livingston und Duggar (1934) und Martin und McKinney (1938) bestimmten die Infektiosität von Vakuolensaft und Cytoplasma virusinfizierter Haare und stellten ein fast ausschließliches Vorkommen des Virus im Cytoplasma fest. Die Bildung von TMV-Einschlußkörpern im Cytoplasma ist von Sheffield (1931 und 1934), Kassanis und Sheffield (1941) und Zech (1952 und 1954) beobachtet und beschrieben worden.

In den bisher erschienenen elektronenmikroskopischen Arbeiten über virusinfizierte Gewebe wird das Cytoplasma kaum berücksichtigt. Es wurde ausschließlich an bereits ausdifferenziertem, symptomatischem Material gearbeitet, in dem das Cytoplasma nur noch spärlich als Cytoplasmawandbelag in Erscheinung tritt. Das Aussehen und die Verteilung des Virus in der Zelle finden hauptsächlich Beachtung, weniger daneben die lichtmikroskopisch sichtbaren Zellorganellen (Black und Mitarb. 1950, Smith 1953, Skotland und Mitarb. 1955, Brandes 1955 und 1956, Nixon 1956 b, Goldin und Fedotina 1956, Matsui 1956). Dagegen ist von biochemischer Seite schon seit Jahren die Bedeutung vergleichender Cytoplasmauntersuchungen gesunder und virusinfizierter Gewebe, besonders zur Klärung der Frage der Virusvermehrung in der Zelle, erkannt und herausgestellt worden (Bonner in Zechmeister 1950, Wildman und Jagendorf 1952, und Caspersson und Thorsson 1952). Wenngleich sich die Zusammenhänge zwischen Cytoplasma und Virusvermehrung bei Pflanzen im Laufe neuerer Untersuchungen über die Nukleinsäuren (Basler und Commener 1956, und Gierer und Schramm 1956) als komplexer erwiesen haben, als zuerst angenommen wurde, bleibt die Bedeutung des Cytoplasmas bestehen (Frey-Wyssling 1955, S. 44).

Lichtmikroskopische Untersuchung des Cytoplasmas

Lichtmikroskopische Cytoplasmauntersuchungen TMV-infizierter Pflanzenzellen wurden von vornherein nur in begrenztem Umfang durchgeführt, da bereits zahlreiche Beobachtungen vorliegen und von den elektronen-

mikroskopischen Untersuchungen weitgehendere Aufschlüsse zu erwarten waren. Die lichtmikroskopischen Beobachtungen beschränken sich daher auf eine Erfassung der Frühphase der Virusbildung in der Zelle und stehen mit der Entwicklung der Viruseinschlußkörper in unmittelbarem Zusammenhang. Den unten folgenden Ergebnissen liegen entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an Prismen und Schleifen in Keim-, Folge- und Blütenblättern zugrunde. Gearbeitet wurde an Samsuntabak mit dem Grünstamm TMV Vulgare und den Gelbstämmen G 2 und G 7. Eine Wiederholung methodischer Einzelheiten an dieser Stelle erscheint unnötig (siehe Untersuchung der Chloroplasten).

Von den hexagonalen Prismen ist bekannt (Literatur siehe Bawden 1950), daß sie entweder unmittelbar im Cytoplasma oder über ein X-Körper-Stadium entstehen. Beide Bildungsweisen konnten in Vitaluntersuchungen bestätigt werden (vgl. Zech 1954). Die Entstehung der X-Körper selbst im Cytoplasma ist für das TMV von Sheffield (1931), für das Kakteenvirus von Amelunxen (1955) beobachtet. Über die Entwicklung der Schleifen aus cytoplasmatischen Ballungen ist bereits ausführlich berichtet worden (Wehrmeyer 1959). Für die Fadenbündel liegen nur spärliche Angaben über die Entwicklungsgeschichte vor. Immerhin konnten Kassanis und Sheffield (1941) alle Übergangsstadien zwischen Einschlußkörpern, die nur amorphes Material enthielten, und solchen, die fast vollständig in nadelige Fibrillen übergegangen waren, erfassen. Eine Entwicklung aus intraplasmatischen, amorphen Körpern ist daher auch für die Fadenbündel anzunehmen, sofern sie nicht durch Umlagerung aus anderen Viruseinschlußkörpern entstehen.

Unter besonderer Berücksichtigung des Cytoplasmas lassen sich die lichtmikroskopischen Untersuchungen daher zusammenfassen:

1. Vor Einsetzen der Viruseinschlußkörperbildung sind in den Zellen der Keim- und frühen Folgeblätter eine erhöhte Plasmaströmung und eine gesteigerte Aufteilung des Vakuolenraumes durch Cytoplasmastränge als Ausdruck der im Cytoplasma vor sich gehenden Veränderungen nach Virusinfektion festzustellen (Dufrenoy 1930, Zech 1952 und 1954).

2. In den angegebenen Geweben kommen alle TMV-Einschlußkörper ausnahmslos im Cytoplasma vor. Die Vakuolen und alle Zellorganellen sind frei von lichtmikroskopisch sichtbaren Virusaggregaten. (Livingston und Duggar 1934, und Martin und McKinney 1938.) Allein Woods und Eck (1948) geben Kerneinschlüsse für einen speziellen TMV-Stamm an.

3. Die gesamte Entwicklung der untersuchten Viruseinschlußkörper findet unmittelbar im Cytoplasma oder in X-Körpern statt und soweit ersichtlich nur dort. Für die Prismen und Fadenbündel liegen gleiche Beobachtungen aus älteren Laubblättern bereits vor (Sheffield 1931 und 1934, und Kassanis und Sheffield 1941).

4. Die Entwicklung der Viruseinschlußkörper (Prismen und Schleifen) ist meist mit einem Schwund des Cytoplasmas bzw. der X-Körper verbunden.

Elektronenmikroskopische Untersuchung des Cytoplasmas

Material und Methode

Die Cytoplasmauntersuchungen wurden an Sekundärblättern 20 und 30 Tage alter, gesunder Kontrollpflanzen des Samsuntabaks durchgeführt. Blattmaterial 40 Tage alter Pflanzen dagegen erwies sich infolge der Plasmaarmut der Zellen als ungeeignet. An virusinfizierten Pflanzen (TMV G 2, Samsuntabak) wurden untersucht:

36 Tage alt, 22 Tage p. i., gesät 7. 2. 1957, fixiert 15. 3. 1957
41 Tage alt, 26 Tage p. i., gesät 21. 2. 1957, fixiert 3. 4. 1957
40 Tage alt, 30 Tage p. i., gesät 24. 4. 1957, fixiert 3. 6. 1957

Da die Pflanzen im Frühjahr rascher wachsen als im Winter, sind die Unterschiede zwischen den drei Serien ausgeprägter als die Altersangabe vermuten läßt. In allen Fällen wurden die Sekundärblätter untersucht. Die beiden ersten Fixationsserien waren für die Cytoplasmauntersuchung entscheidend. Angaben zur Methode sind im Abschnitt über die elektronenmikroskopische Untersuchung der Chloroplasten zu ersehen.

Wie für die Lichtmikroskopie besteht in der elektronenmikroskopischen Cytologie die Schwierigkeit in der Lokalisation der virusinfizierten Zelle in einem inhomogen virusinfizierten Gewebe. Diese Lokalisation kann nur durch den eindeutigen Nachweis der Viren in der Zelle mit Hilfe des Elektronenmikroskops erfolgen. Daher ist die Kenntnis aller Formen des TMV von grundlegender Bedeutung und eine Voraussetzung für alle weiteren cytologischen Untersuchungen. Die sublichtmikroskopischen Formen des TMV in der Wirtszelle — soweit erfaßbar — werden daher im folgenden zuerst dargestellt. Für die sich daran anschließende vergleichende Cytoplasmaanalyse gesunder und virusinfizierter Pflanzenzellen ist zu erwähnen, daß durchaus nicht in jeder Zelle der untersuchten Sekundärblätter virusinfizierter Pflanzen das Virus nachweisbar ist. In den Fällen, in denen der Virusnachweis in der betreffenden Zelle elektronenmikroskopisch nicht möglich war, wird daher nur von virusinfizierten Geweben gesprochen.

Vorkommen und Aspekt der sublichtmikroskopischen Formen des TMV in der Wirtszelle

Alle sublichtmikroskopischen Formen des TMV, soweit sie im Elektronenmikroskop mit den angegebenen Untersuchungsmethoden sichtbar gemacht werden konnten, treten ursprünglich im Cytoplasma auf und sind vom Cytoplasma umgeben oder durch eine Grenzschicht gegen den Zellsaftraum abgetrennt (Abb. 9).

Auch für alle lichtmikroskopisch sichtbaren Prismen und frühen Schleifenformen ist ein cytoplasmatischer Belag von wechselnder Dicke elektronenmikroskopisch nachweisbar. Vermutlich wird erst durch die Zerstörung dieser Begrenzung infolge der Präparation der Gesamtraum der Zelle mit Partikeln und Aggregaten des TMV erfüllt (Brandes 1955 und 1956, Goldin und Fedotina 1956, Nixon 1956b). Eine sekundäre Verlagerung des Virus ist bei der vorliegenden Präparation und Untersuchungsmethode nur bei unzulänglicher Fixation und bei der Her-

stellung der Ultradünnschnitte unter Umständen möglich. Das gemeinsame Auftreten von Virus und Cytoplasma in dichten, räumlich ineinandergreifenden Verbänden spricht für einen ursprünglichen und ungestörten Erhaltungszustand (Abb. 10 und 12).

Das Aussehen des sublichtmikroskopischen Virus in den Wirtszellen ist unterschiedlich: die ursprüngliche TMV-Partikellänge von ungefähr 300 mμ und längsaggregierte Fibrillen kommen vor. Die längsaggregierten fibrillären Formen wurden am häufigsten angetroffen, und zwar sowohl in den Sekundärblättern (Abb. 12 und 13) als auch in den Blütengeweben (Abb. 11).

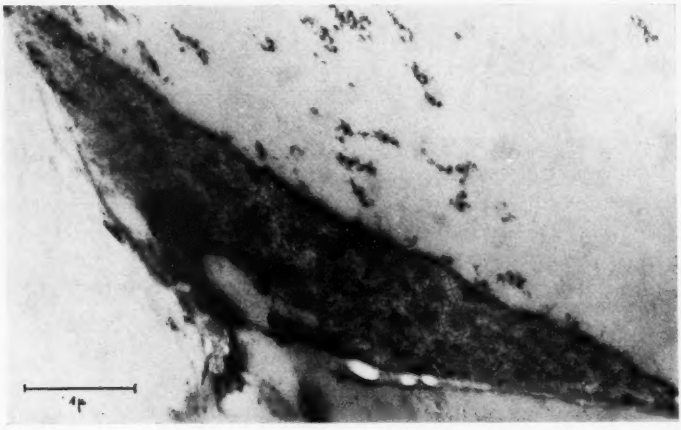


Abb. 9. TMV-Partikeln mit geringem Ordnungsgrad aus dem Blütengewebe. Eine distinkte Grenzschicht trennt die Viren vom virusfreien Vakuolenraum (pr. 8800×), 17.600×.

Die Fibrillen liegen inselartig im Cytoplasma eingebettet in wirren Knäuelen oder auch mit stärker einsetzender Parallelorientierung zu Bündeln und Strängen; selbst benachbarte Virusbezirke können im Fibrillenverlauf unterschiedlich orientiert sein. Durch längsseitige Parallellagerung fibrillären Virusmaterials wird teilweise ein erstaunlich hoher Ordnungsgrad erreicht, wie er sonst nur in den hexagonalen Prismen vorkommt. In Abbildung 14 *b* ist die charakteristische Partikeldicke des TMV von 15—20 mμ deutlich erkennbar.

Neben den fibrillären Formen tritt das TMV in Partikeln mit unterschiedlichem Ordnungsgrad auf. In Abbildung 10 sind die Partikeln von 300 mμ Länge durch längsseitige Parallellagerung zu Blöcken vereint. Der Schritt von diesem Stadium bis zur Ausbildung einfacher Schichtstrukturen ist elektronenmikroskopisch belegbar. Daß daneben auch weniger geordnete Partikelansammlungen möglich sind, zeigt Abbildung 9 aus dem Blütengewebe. Die Entstehung der Partikeln durch Zerfall fibrillär aggregierten Virus ist grundsätzlich möglich, scheint aber in Abbildung 10 nicht vorzuliegen: Das lückenlose räumliche Ineinandergreifen von Cytoplasma und

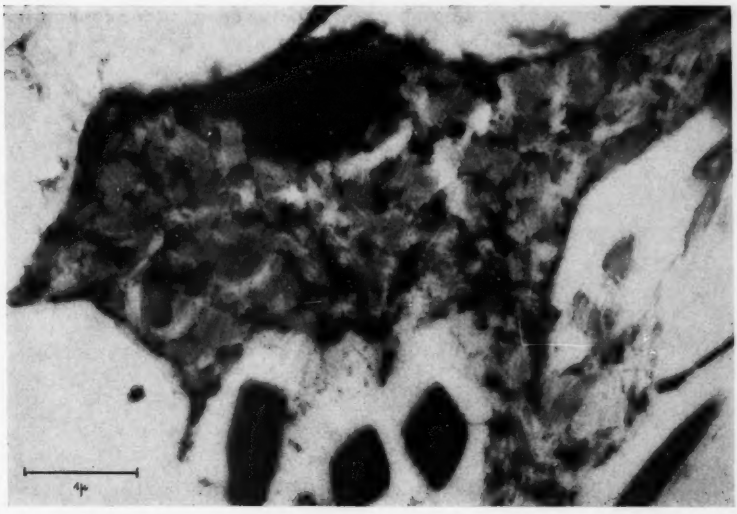


Abb. 10. TMV in der Partikellänge von ungefähr 300 mμ zu Blöcken längsseitig vereint im Cytoplasmaverband (pr. 8800×), 17.600×.

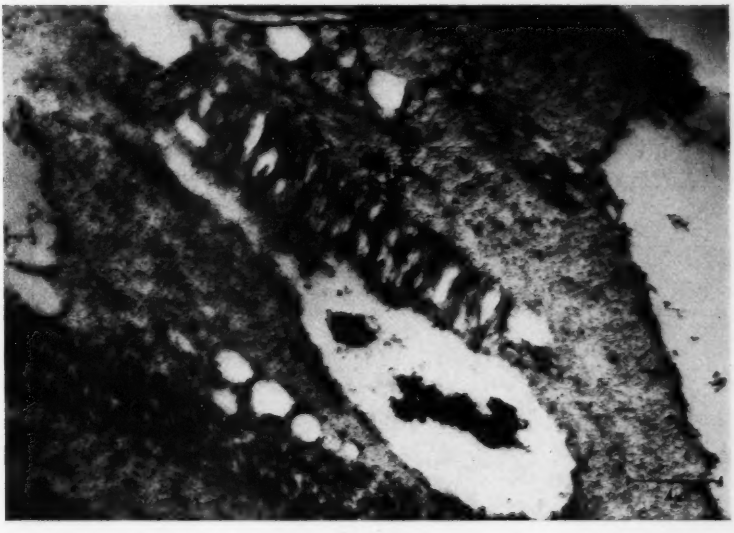


Abb. 11. Zwei Schleifen im Längsschnitt (Bildmitte und links unten) in ihrer cytoplasmatischen Umgebung aus dem Blütenblatt. Lokales Auftreten von parallelisierten Virusfibrillen (pr. 8800×), 14.960×.

Virusblöcken unterstützt die Annahme einer Strukturerhaltung in ursprünglicher Form und einer primär gegebenen Partikellänge von 300 mμ in der Zelle. Diese Partikellänge ist auch für die lichtmikroskopisch sichtbaren

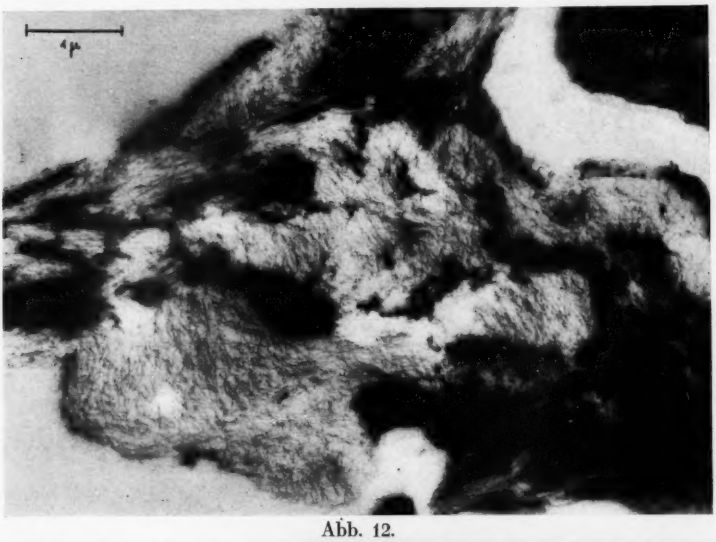


Abb. 12.

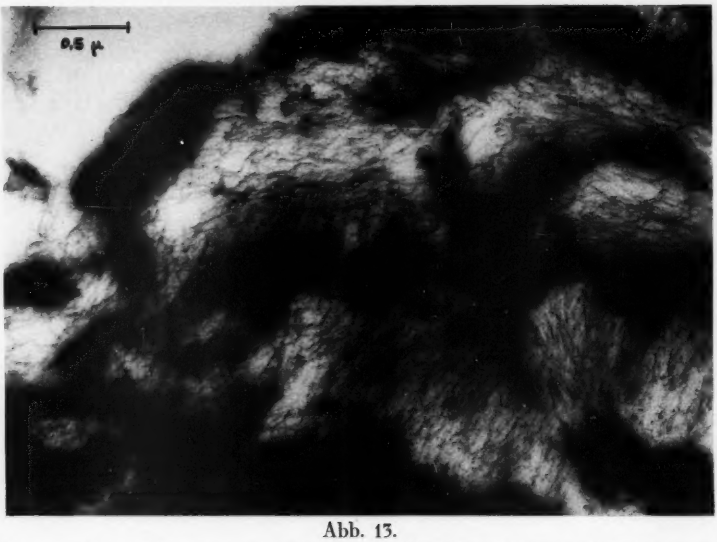


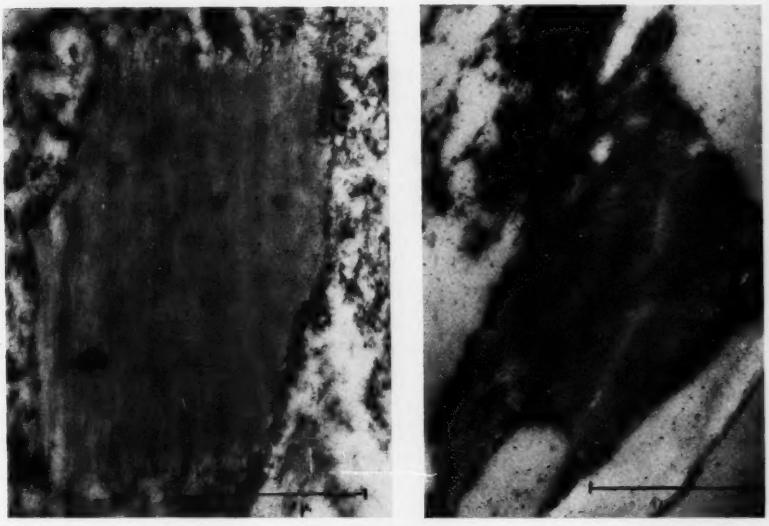
Abb. 13.

Abb. 12 und 13. Gemeinsames Auftreten von fibrillärem Virus und Cytoplasma in dichten, räumlich ineinandergreifenden Verbänden im Sekundärblattgewebe des Tabaks. Abb. 12 (pr. 8800×), 17.600×; Abb. 13 (pr. 15.000×), 30.000×.

hexagonalen Prismen bei ursprünglicher Strukturerhaltung elektronenmikroskopisch erwiesen (Wehrmeyer 1957).

Vergleichende Cytoplasmaanalyse gesunder und virusinfizierter Pflanzenzellen

Die elektronenmikroskopische Strukturanalyse des Cytoplasmas pflanzlicher Zellen hat erst in jüngster Zeit eingesetzt. Unsere derzeitigen Kenntnisse sind daher noch so wenig umfangreich und gefestigt, daß allein schon aus diesem Grunde weitere Bemühungen auf diesem Gebiet notwendig und



a *b*

Abb. 14 *a* und *b*. Zwei Formen fibrillären Virusmaterials von hohem Ordnungsgrad aus einer Zelle. Der charakteristische Partikeldurchmesser des TMV von 15—20 mμ ist in *b* deutlich erkennbar. *a* (pr. 8800×), 22.000×, *b* (pr. 8800×), 26.400×.

wünschenswert erscheinen. Die vorliegenden Untersuchungen wurden auf die Fragestellung präzisiert: Sind die bereits bekannten und beschriebenen cytoplasmatischen Strukturen, nämlich die Cytonemata (Strugger 1956c und 1957) und die Golgikörper (Perner 1957 und 1958), auch charakteristische Strukturen des gesunden Cytoplasmas nichtinfizierten Tabaks? Inwieweit liegen diese Strukturen auch im Cytoplasma TMV-infizierter Zellen des Tabaks vor?

Die von Strugger (1956c und 1957) mit Hilfe der Uranylacetat-Kontrastrierung (Strugger 1956b) im Cytoplasma der Pflanzen entdeckten schraubigen Strukturelemente (Cytonemata) konnten bei gleicher Untersuchungsmethode in den Sekundärblättern 20 und 30 Tage alter, gesunder Tabakpflanzen, also oberirdisch und in nicht-meristematischen Geweben, regelmäßig nachgewiesen werden. Sie stimmen in ihren Dimensionen mit den von Strugger (1957) an Wurzelspitzen von Allium ge-

wonnenen Ergebnissen nahezu völlig überein (Fadendurchmesser 15 mμ, Schraubendurchmesser 46 mμ, Ganghöhe 32 mμ).

Diese sublichtmikroskopischen Strukturelemente des Cytoplasmas gesunder Tabakpflanzen konnten auch in virusinfizierten Geweben nachgewiesen werden: Sekundärblattgewebe 36 Tage alter Tabakpflanzen, 22 Tage nach der Inokulation mit TMV G 2; die Meßwerte stimmen mit den Befunden für Cytonemata aus den gesunden Kontrollpflanzen in etwa überein (Fadendurchmesser 16 mμ, Schraubendurchmesser 40 mμ, Ganghöhe 30 mμ).

Die von Perner (1957) elektronenmikroskopisch näher analysierten Strukturen des Cytoplasmas in den Wurzeln von Angiospermen, die dem Golgiapparat der tierischen Zelle cytomorphologisch entsprechen und als Golgiapparat der höheren Pflanzen bezeichnet und publiziert wurden (vgl. Hodge und Mitarb. 1956 „endoplasmatisches Reticulum" und Strugger 1957 „Fadenbüschel"), konnten nun auch in oberirdischen Organen höherer Pflanzen, nämlich den Sekundärblättern des Samsuntabaks, nachgewiesen werden. Der Nachweis gelang in den Sekundärblättern 20 und 30 Tage alter, gesunder Pflanzen. Völlig gleiche Strukturen wurden auch in den virusinfizierten Zellen der Sekundärblätter keimlingsinfizierten Samsuntabaks aufgefunden, und zwar in 36 Tage alten Pflanzen, 22 Tage nach der Inokulation mit TMV G 2. In den Sekundärblättern 40 und 41 Tage alter Pflanzen gelang der Nachweis dagegen bisher nicht oder nicht eindeutig. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Golgikörpern aus gesunden und virusinfizierten Geweben festgestellt. Als Mittelwerte aus 10 Messungen an Golgikörpern gesunder und virusinfizierter Gewebe wurden erhalten: Länge 0,72 μ, Breite 0,15 μ, Schichtdicke 0,02 μ, Zahl der Schichten 4—8, häufig 6. Mit Ausnahme der Länge, die mit 0,72 μ unter der von Perner (1957) angegebenen Größe von etwa 1 μ liegt, entsprechen die Dimensionen der Golgikörper vom Tabak denen anderer Angiospermen.

Die Wahrscheinlichkeit, in ausreichendem Maße cytoplasmatische Strukturen anzutreffen, wird mit zunehmendem Alter und Differenzierungsgrad der Gewebe immer geringer; der Virusnachweis aber gelingt andererseits in den Zellen mit zunehmendem Infektionsalter der Gewebe immer häufiger. Hier stehen einer weitgehenden vergleichenden Strukturanalyse grundsätzliche Schwierigkeiten entgegen, und die Fälle, in denen Virus und Cytoplasma in größerem Umfange nebeneinander angetroffen werden, sind nur durch geeignete Wahl des Untersuchungszeitpunktes der Gewebe zu mehren.

Diskussion

Viren überhaupt erst einmal in ihren Wirtszellen elektronenmikroskopisch nachgewiesen zu haben, ist das Verdienst von Black und Mitarb. (1950), Smith (1953) und Brandes (1955). Aussagen über die Verteilung des Virus in den Wirtszellen sind kaum oder nur sehr vorsichtig erfolgt, da mit einer Auflösung des Einbettungsmittels der Ultradünnschnitte vor der Schrägbedampfung eine Verlagerung der Viren möglicherweise verbunden ist. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen meist über das ganze Zellumen hin verstreute Viruspartikeln (Brandes 1953 und 1956, Gol-

din und Fedotina 1956, Nixon 1956 b). Auf Grund der neuen Methode zum Virusnachweis in den Zellen mit Hilfe der Uranylacetat-Kontrastierung (Strugger 1956 b) stellen die vorliegenden elektronenmikroskopischen Befunde über die Virusgegenwart im Cytoplasma einen wesentlichen Beitrag zum Lokalisationsproblem. Sie stehen in völliger Übereinstimmung mit den aus Infektiositätsbestimmungen ermittelten Ergebnissen über die Virusverteilung in Zellsaft und Cytoplasma von Livingston und Duggar (1934) und Martin und McKinney (1938).

Die von Brandes (1956) gestellte Frage nach der ursprünglichen Form des TMV in der Wirtszelle kann dahin beantwortet werden, daß sowohl Stäbchen von 300 mμ als auch Fibrillen von erheblich größerer Länge ursprünglich in der Zelle angetroffen werden. Diese nur elektronenmikroskopisch eindeutig erfaßbaren Stäbchen und Fibrillen bilden durch längsseitige Parallellagerung Aggregationsprodukte und erscheinen schließlich als hochgeordnete, nun auch lichtmikroskopisch sichtbare Formen — im Falle der Stäbchen als hexagonale Prismen, im Falle der Fibrillen als Schleifen und Fadenbündel — in der infizierten Zelle.

Zusammenfassung

1. Die Chloroplasten in TMV-infizierten Zellen des frühen Folgeblattbereichs werden licht- und elektronenmikroskopisch im Vergleich mit gesunden Kontrollpflanzen untersucht. Es gibt keinen eindeutigen Hinweis für eine Virusproduktion in oder in unmittelbarer Beziehung zu den Chloroplasten; vielmehr sprechen alle Untersuchungsergebnisse für eine von den Chloroplasten unabhängige Virusproduktion, die allerdings die Chloroplasten sekundär beeinträchtigen kann.

2. Das Cytoplasma in virusinfizierten Zellen des frühen Folgeblattbereichs wird licht- und elektronenmikroskopisch im Vergleich mit gesunden Kontrollpflanzen untersucht. Alle sublichtmikroskopischen Formen des TMV, soweit sie im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden konnten, treten im Cytoplasma auf. Die charakteristische Partikellänge von 300 mμ ist sowohl in den hexagonalen Prismen als auch in sublichtmikroskopischer Form primär in der Zelle gegeben.

Literatur

Amelunxen, F., 1956: Beobachtungen über die Entwicklung der Eiweißspindeln bei Cactaceen. Protoplasma *45*, 164.

Bald, J. G., 1948: The development of amoeboid inclusion bodies of tobacco mosaic virus. Austral. J. Sci. Res. Ser. B *1*, 458.

Basler, E. jr., and B. Commener, 1956: The effect of tobacco mosaic virus biosynthesis on the nucleic acid content of tobacco leaf. Virology (New York) *2*, 13.

Bawden, F. C., 1950: Plant viruses und virus diseases. Chronica Botanica Co., Waltham, Mass. 3. Aufl.

Black, L. M., C. Morgan and R. W. G. Wyckoff, 1950: Visualisation of tobacco mosaic virus within infected cells. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. *73*, 119.

Bonner, J., 1950: Plant proteins. Fortschr. Chem. org. Naturstoffe *6*, 290.

Brandes, J., 1955: Elektronenmikroskopischer Nachweis von Pflanzenviren in ihren Wirtszellen. Naturwiss. *42*, 101.
— 1956: Über das Aussehen und die Verteilung des Tabakmosaikvirus im Blattgewebe. Phytopath. Z. *26*, 93.
Caspersson, T., und K. G. Thorsson, 1953: Virus und Zellstoffwechsel. Verh. Ges. dtsch. Naturf., Essen 1952.
Cohen, M., and E. Bowler, 1953: Lamellar structure of the tobacco chloroplast. Protoplasma *42*, 414.
Cook, M. T., 1947: Viruses and virus diseases of plants. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minn.
Dufrenoy, J., 1930: Maladies à virus du tabac. Phytopath. Z. *2*, 321.
Esau, K., 1938: Some anatomical aspects of plant virus disease problems. Bot. Review *4*, 548.
— 1948: Desgl. Bot. Review *14*, 413.
— 1944: Anatomical and cytological studies on beet mosaic. J. Agr. Res. *69*, 93.
Frey-Wyssling, A., 1955: Die submikroskopische Struktur des Cytoplasmas. Protoplasmatologia II. A, 2. Springer-Verlag, Wien.
Gierer, A., und G. Schramm, 1956: Die Infektiosität der Nukleinsäure aus Tabakmosaikvirus. Z. Naturforsch. *11 b*, 138.
Goldin, M. I., and V. L. Fedotina, 1956: Mosaic virus of tobacco, studied by the method of ultra-thin sections (russ.). Dokl. Akad. Nauk S. S. S. R. *111*, 1115.
Grave, G., 1954: Studien über die Entwicklung der Chloroplasten bei *Agapanthus umbellatus*. Protoplasma *44*, 273.
Hirai, T., and C. Matsui, 1956: An electron microscope study of the wheat leaf cells infected with the wheat mosaic virus, *Marmor Tritici* Holmes. Forsch. Gebiet Pflanzenkrankh., Kyoto, *6*, 61.
Hodge, A. J., J. D. McLean, and F. V. Mercer, 1955: Ultrastructure of the lamellae and grana in the chloroplasts of *Zea mays* L. J. Biophys. a. Biochem. Cytology *1*, 605.
— — — 1956: A possible mechanism for the morphogenesis of lamellar systems in plant cells. J. Biophys. a. Biochem. Cytology *2*, 397.
Hoggan, I. A., 1927: Cytological studies on virus diseases of Solanaceous plants. J. Agr. Res. *35*, 651.
Holmes, F. O., 1930: Local and systemic increase of tobacco mosaic virus. Amer. J. Bot. *17*, 789.
— 1934: Increase of tobacco-mosaic virus in the absence of chlorophyll and light. Phytopathology *24*, 1125.
Iwanowski, D., 1903: Über die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze. Z. Pflanzenkrankh. *13*, 1.
Kassanis, B., and F. M. L. Sheffield, 1941: Variations in the cytoplasmic inclusions by three strains of tobacco mosaic virus. Ann. Appl. Biol. *28*, 360.
Kausche, G. A., und H. Ruska, 1940: Über den Nachweis des Tabakmosaikvirus in den Chloroplasten viruskranker Pflanzen. Naturwiss. *28*, 303.
Köhler, E., 1942: Die Überempfindlichkeitsreaktion bei *Solanum nodiflorum* Jacq. gegenüber Stämmen des Tabakmosaik- und Kartoffel-X-Virus. Z. Pflanzenkrankh. *52*, 450.
— und M. Klinkowski, 1954: Viruskrankheiten. Sorauers Hdbuch der Pflzkrankh. II. 1. 6. Aufl.
Koshimizu, Y., and N. Iizuka, 1957: Origin and formation of intracellular inclusions associated with two leguminous virus diseases. Protoplasma *48*, 113.

Leyon, H., 1953: Virusformation in chloroplasts. Exper. Cell Res. *4*, 362.
— und D. von Wettstein, 1954: Der Chromatophoren-Feinbau bei den Phaeophyceen. Z. Naturforsch. *9 b*, 471.
Livingston, L. G., and B. M. Duggar, 1934: Experimental procedures in a study of the location and concentration within the host cell of the virus of tobacco mosaic. Biol. Bull. *67*, 504.
Martin, L. F., and H. H. McKinney, 1938: Tobacco-mosaic virus concentrated in the cytoplasm. Science N. S. *88*, 458.
Matsui, C., 1956: Virus (Japan) *6*, 337. (engl.): zit. bei Hirai, T., und C. Matsui, 1956 (s. o.).
Mühlethaler, K., 1955: Untersuchungen über die Struktur und Entwicklung der Proplastiden. Protoplasma *45*, 264.
— 1957: Gegenwärtiger Stand der elektronenmikroskopischen Erforschung der Pflanzenzelle. Naturwiss. *44*, 204.
Nixon, H. L., 1956 a: Electron Microscopy. Rothamsted Experiment. Station; zit.: Biochem. J. *63*, 34 P.
— 1956 b: An estimate of the number of tobacco mosaic virus particles in a single hair cell. Virology (New York) *2*, 126.
Perner, E. S., 1957: Zum elektronenmikroskopischen Nachweis des „Golgi-Apparates" in den Zellen höherer Pflanzen. Naturwiss. *44*, 336.
— 1958: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Cytomorphologie des sogenannten „Golgisystems" in Wurzelzellen verschiedener Angiospermen. Protoplasma *49*, 407.
Petersen, P. D., and H. H. McKinney, 1938: The influence of four mosaic diseases on the plastid pigments and chlorophyllase in tobacco leaves. Phytopathology *28*, 329.
Resühr, B., 1942: Zur Chemie der Symptombildung viruskranker Pflanzen. Z. Pflanzenkrankh. *52*, 63.
Rischkov, V. L., and V. A. Smirnova, 1940: The tobacco mosaic virus content of tomato plastids. Mikrobiol. *9*, 170.
Sheffield, F. M. L. 1931: The formation of intracellular inclusions in Solanaceous hosts infected with aucuba mosaic of tomato. Ann. Appl. Biol. *18*, 471.
— 1934: Experiments bearing on the nature of intracellular inclusions in plant virus diseases. Ann. Appl. Biol. *21*, 430.
Skotland, C., D. Hagedorn, and M. A. Stahmann, 1955: Electron microscopy of tobacco mosaic virus in situ. Phytopathology *45*, 603.
Smith, K. M., 1953: A note on the observation of viruses in the cells of infected plants. Biochem. Biophys. Acta (Amsterdam) *10*, 210.
Sorokin, H., 1927: Phenomena associated with the destruction of the chloroplasts in tomato mosaic. Phytopathology *17*, 363.
Stanley, W. M. J., 1938: Aucuba mosaic virus protein isolated from diseased, excised Tomato roots grown in vitro. J. Biol. Chem. (Am.) *126*, 125.
Steere, R. L., 1952: Virus increment curves obtained from counts of particles in clarified plant juice. Amer. J. Bot. *39*, 211.
Steinmann, E., and F. S. Sjöstrand, 1955: The ultrastructure of chloroplasts. Exper. Cell Res. *8*, 15.
Strugger, S., 1956 a: Elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Chloroplasten von *Chlorophytum comosum*. Ber. dtsch. bot. Ges. *69*, 177.
— 1956 b: Die Uranylacetat-Kontrastierung für die elektronenmikroskopische Untersuchung von Pflanzenzellen. Naturwiss. *43*, 337.
— 1956 c: Schraubig gewundene Fäden als sublichtmikroskopische Bauelemente des Cytoplasmas. Naturwiss. *43*, 451.

Strugger, S., 1957: Schraubig gewundene Fäden als sublichtmikroskopische Strukturelemente des Cytoplasmas. Ber. dtsch. bot. Ges. *70*, 91.
— und E. S. Perner, 1956: Beobachtungen zur Frage der ontogenetischen Entwicklung des somatischen Chloroplasten. Protoplasma *46*, 711.
Wehrmeyer, W., 1957: Darstellung und Strukturordnung eines Tabakmosaikvirus-Einschlußkörpers in der Zelle. Naturwiss. *44*, 519.
— 1959: Entwicklungsgeschichte, Morphologie und Struktur von Tabakmosaikvirus-Einschlußkörpern unter besonderer Berücksichtigung der fibrillären Formen. Protoplasma (im Druck).
White, P. R., 1934: Multiplication of the viruses of tobacco and aucuba mosaics in growing excised tomato root tips. Phytopathology *24*, 1003.
Wildman, S., and A. Jagendorf, 1952: Leaf proteins. Ann. Rev. Plant Physiol. *3*, 131.
Woods, M. W., and H. G. DuBuy, 1951: The action of mutant chondriogenes and viruses on plant cells with special reference to the plastids. Amer. J. Bot. *38*, 419.
— and R. V. Eck, 1948: Nuclear inclusions by a strain of tobacco mosaic virus. Phytopathology *38*, 852.
Zech, H., 1952: Untersuchungen über den Infektionsvorgang und die Wanderung des Tabakmosaikvirus im Pflanzenkörper. Planta *40*, 461.
— 1954: Morphologische und cytochemische Beobachtungen an Tabakmosaikvirus-infizierten Protoplasten von *Nicotiana tabacum*. Exper. Cell Res. *6*, 560.
— und L. Vogt-Köhne, 1955: Ultraviolettmikrospektrographische Untersuchungen an Tabakmosaikvirus in situ. Naturwiss. *42*, 337.
— — 1956: Untersuchungen zur Reproduktion des Tabakmosaikvirus. Exper. Cell Res. *10*, 458.

Nachtrag

Während der Drucklegung erschien die Arbeit von

Matsui, C., 1958: Pathological cytology of tobacco leaf infected with tobacco mosaic virus III. J. Biophys. a. Biochem. Cytology *4*, 831.

in der die Ergebnisse der vorliegenden Veröffentlichung bestätigt werden.

Vergleichende Untersuchungen über das Plasmalemma von Meeresalgen

Von

Themistokles Diannelidis und **Konstantinos Mitrakos**

Aus dem Botanischen Institut der Universität Thessaloniki

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. September 1958)

I. Einleitung

Die verschiedenen Theorien über Permeabilität der Zelle (Overton, Ruhland, Collander, Bärlund u. a.) setzen voraus, daß der Diffusionswiderstand für die verschiedenen Stoffe hauptsächlich in den Hautschichten lokalisiert sei. Dieser Auffassung stimmen nicht alle Forscher zu. Als erster hat es Lepeschkin als unwahrscheinlich betrachtet, daß die Hautschichten gründlich verschieden in ihren osmotischen Eigenschaften vom Binnenplasma sind. Nach der heute geltenden Lipoidfiltertheorie hängt das Permeiervermögen der meisten lebensunschädlichen Substanzen von ihrer Lipoidlöslichkeit ab, während kleinmolekulare Stoffe schneller permeieren, als man es nach ihren Löslichkeitseigenschaften erwarten würde. Höfler meint, daß das Plasma der vakuolisierten Pflanzenzelle durch und durch aus einer zusammenhängenden Phase mit lipoiden Lösungseigenschaften besteht, die von der Außenfläche bis an die Innenfläche des Plasmaschlauches reicht; dann würden nicht nur die Plasmahautschichten als lipoides Lösungsmittel wirken, sondern auch das Binnenplasma. Permeierende Stoffe lösen sich von außen und benutzen den Lipoidweg bis an die Vakuole, und dort treten sie nach Maßgabe ihres Verteilungskoeffizienten in den wäßrigen Zellsaft hinüber. Fluoreszenzfärbungen mit Rhodamin B, einem unschädlichen basischen Farbstoff, der von pH 2 bis 11 als elektroneutrales undisoziiertes Farbbasenmolekül vorliegt, zeigen in Zellen mit „leeren" Zellsäften Vitalfärbung des Protoplasmas (Höfler 1933, Strugger 1938, 1949). Die Färbung beruht auf der Löslichkeit der Farbbasen im Cytoplasma. Diese Färbung veranschaulicht, daß das Plasma aus einer zusammenhängenden Phase mit lipoiden Lösungseigenschaften besteht (Höfler 1933).

Bekanntlich bietet der Tonoplast oft für hydrophile Stoffe den Hauptwiderstand. Alkalisalze dringen leichter durch das Plasmalemma und Bin-

nenplasma und schwer, in geringerer Menge, durch den Tonoplasten bis in den Zellsaft. Die Intrabilität des Protoplasten für die Salze ist größer als seine Permeabilität.

Schon früh und unabhängig vom Problem der Permeabilität ist die Frage nach stofflichen Unterschieden der Plasmahautschichten gestellt worden. Der Tonoplast wurde eingehend untersucht. Chambers und Höfler (1931) haben gezeigt, daß der Tonoplast eine leicht bewegliche, kohäsive, mit Wasser nicht mischbare Flüssigkeit vorwiegend lipoiden Charakters ist; er zeigt eine starke Oberflächenspannung, aber keine elastischen Eigenschaften. Die mikrochirurgischen Untersuchungen von Plowe (1931) haben gezeigt, wie groß die Elastizität des Plasmalemmas gegenüber der des Mesoplasmas ist. Tonoplast und Plasmalemma sind substantiell verschieden. Seifriz (1936) und Frey-Wyssling (1938, 1948) schließen, daß am Aufbau des Plasmalemmas Proteinmoleküle einen sehr wesentlichen Anteil haben. Nach Frey-Wyssling ist es wahrscheinlich, daß das Eiweißgerüst des Cytoplasmas in den äußeren Grenzgebieten dichter gebaut ist und nach innen ganz allmählich in ein viel lockereres Gewebe übergeht. Es wird angenommen, daß am Aufbau des Plasmalemmas Protein- und Lipoidmoleküle beteiligt seien (Danielli 1952, Cholnoky 1952, Höfler u. a.).

Die Ausbildung des Plasmalemmas bei Zellen verschiedener Kategorien, zuerst solcher der an Wasser grenzenden Zellen gegenüber denen von Landpflanzen, wurde Gegenstand von Untersuchungen Höflers (1951). Er prüfte weiter die Ausbildung des Plasmalemmas und seiner Schutzfunktion vom Standpunkt der vergleichenden Protoplasmatik bei verschiedenen Zelltypen, wie Epidermis- und Parenchymzellen von Landpflanzen, einzelligen und fadenförmigen Süßwasseralgen. Die Schutzfunktion des Plasmalemmas hängt mit dem Resistenzproblem des Protoplasten zusammen. Die Resistenz der Zellen gegen schädigende Wirkung verschiedener Substanzen hängt von der stärkeren Ausbildung des Plasmalemmas ab, soweit es sich nicht um verschiedene Empfindlichkeit der Cytoplasmen gegen einen ins Binnenplasma eintretenden Stoff handelt. Nach Biebl (1947 bis 1952) unterscheidet man umweltsbedingte „ökologische" Resistenz und nicht umweltbezogene „konstitutionelle" Resistenz. Die Intrabilität des Protoplasten, d. h. die Durchlässigkeit des Plasmalemmas kann niedrig oder hoch sein, je nach der Dichte des Plasmalemmas; damit hängt wohl die Größe der konstitutionellen Resistenz zusammen.

Die Meeresalgen stellen nun ein sehr interessantes Material für vergleichende protoplasmatische Untersuchungen dar, weil Vertreter verschiedener Pflanzenstämme unter ähnlichen ökologischen Bedingungen nebeneinander leben. Die Protoplasten der Phaeophyceen, Chlorophyceen und Rhodophyceen zeigen, wie bekannt, viele Unterschiede (in Viskosität, Permeabilität usw.).

Die vorliegenden Untersuchungen beziehen sich auf die Ausbildung des Plasmalemmas einiger Meeresalgen. Es ist interessant, an solchen zu untersuchen, ob es konstitutionelle Unterschiede des Plasmalemmas gibt. Wir haben mit der einfachen Methode von Höfler, der Plasmolyse mit Natriumkarbonat, gearbeitet.

Natriumkarbonat gehört zu den wasserlöslichen Stoffen, die bei der Permeation ihren Hauptwiderstand im Tonoplasten finden. Na_2CO_3-Lösungen haben stark alkalische Reaktion und töten meist das Plasma bis an die Vakuolenwand hin. Die Wirkung der Na_2CO_3-Lösungen an verschiedenen Pflanzenzellen hängt nach Höfler (1951) von der Schutzfunktion der äußeren Plasmagrenzschicht ab, von der ihre Resistenz bestimmt wird. Höfler unterscheidet folgende Fälle:

1. Zellen mit schwach ausgebildetem Plasmalemma werden unmittelbar getötet oder es tritt in ihnen primäre Tonoplastenplasmolyse ein.

2. Zellen mit mäßig stark ausgebildetem Plasmalemma, das den Zutritt der Na_2CO_3-Moleküle verweigert, werden zuerst normal plasmolysiert, bald nachher stirbt das Plasma ganz oder bis auf die Vakuolenhäute ab. In diesem Fall wird im Plasma oft Kappenplasmolyse auftreten, infolge quellender Wirkung des Salzes, und es folgt ein sekundäres Tonoplastenstadium.

3. Zellen mit sehr starkem Plasmalemma sind so geschützt und zeigen so geringe Soda-Intrabilität, daß sie tagelang primäre Plasmolyse ertragen.

Wie die hypotonischen Na_2CO_3-Lösungen gewirkt haben, ersehen wir aus der Möglichkeit, nachträglich Plasmolyse durch hypertonische Traubenzuckerlösung herbeizuführen. Natriumkarbonat wirkt auf das Plasmalemma wie Kaliumoxalat, durch welches Weber die Bedeutung des Ca für den Aufbau der äußeren Grenzschicht bewiesen hat. Nach der Resistenz der Desmidiaceen gegen Na_2CO_3 läßt sich annehmen, daß kein Kalzium zum Aufbau ihres derben Plasmalemmas gebraucht wird (Höfler 1951).

Wir haben parallel die Wirkung von Natriumkarbonat- und Kaliumoxalatlösungen auf unser Material geprüft. Wo Na_2CO_3 zu schwach wirkte, haben wir Kalilauge benutzt. Cholnoky (1952) hat eine ungleiche protoplasmatische Wirkung für KOH auf verschiedene Blumenblattzellen festgestellt. Es werden 0,01 mol bzw. 0,1 mol KOH zur plasmolysierenden *n*-KNO_3-Lösung zugesetzt. Nach Cholnoky werden Hautschichten, in welchen die lipoiden Phasen dominieren, durch Verseifung schneller, dagegen diejenigen, in welchen Eiweißsphasen die größte Rolle spielen, langsamer durch KOH zerstört. Wegen des hohen osmotischen Wertes der Meeresalgen haben wir Lösungen bis zu 2 mol KNO_3 mit KOH-Zusatz verwendet.

Das Material wurde jeden Tag an den Küsten von Thermaikos (Golf von Thessaloniki) gesammelt und frisch verwendet. Hauptsächlich sind voluminöse Algen untersucht worden. Fadenalgen und flächig ausgebildete Algen in größerer Zahl bleiben noch zu untersuchen.

Die Lösungen wurden mit Merck-Chemikalien „pro Analyse" in bidestilliertem Wasser hergestellt. Die Herstellung von Na_2CO_3-Lösungen in Meereswasser ist nicht möglich, da Fällung eintritt. Es handelt sich um prinzipiell methodische Schwierigkeiten, die nicht zu vermeiden sind, schon wegen der ungleichen Resistenz verschiedener Zellen gegen Lösungen, die nicht die normale Salzkombination des Meereswassers enthalten (mangelndes Ionengleichgewicht). Wenn wir anderseits Soda- und Traubenzuckerlösungen in destilliertem Wasser benutzen, wie wir es tun müssen, dann

sind die durch Salzmangel bedingten Schädigungen des Plasmas in den beiderlei Lösungen bei kurzfristigen Versuchen die gleichen. Wenn demnach die Sodalösung schneller tötet, so läßt sich schließen, daß das Plasmalemma der betreffenden Zellen die größere Empfindlichkeit für Na_2CO_3 bedingt.

II. Versuche

1. Phaeophyceae

Vergleichende protoplasmatische Untersuchungen an Phaeophyceen sind von Höfler (1932), Chalaupka (1939), Biebl (1938) durchgeführt worden. Der Protoplast von Arten der Tiefzone zeigt sich nach Biebl für die Salze des Meereswassers nicht permeabel, während solche der Gezeitenzonen in Seewasserkonzentrationen, die ein wenig über den osmotischen Wert hinausgehen, permeabel sind, nicht aber in höheren Konzentrationen (Biebl 1938, Bünning 1934). Höhere Braunalgen, Fucales und Laminariales, sind mit Plasmolysemethoden nicht untersucht worden.

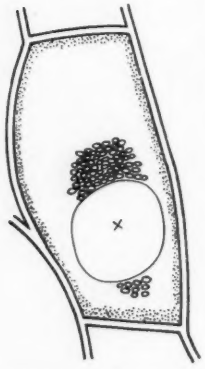


Abb. 1. *Sargassum linifolium*, Zelle von der inneren Schicht des Hauptstammes in 2 mol Traubenzuckerlösung nach Vorbehandlung mit 0,05 mol Na_2CO_3. Tonoplastenplasmolyse, Protoplast abgestorben (x Vakuole).

Zellen aus folgenden Gewebsalgen wurden geprüft: *Cystosira abrotanifolia, C. barbata, C. ericoides, Sargassum linifolium* und *Padina pavonia*. An den Cystosiren wurden Schnitte der Länge nach vom unteren Teil des Hauptstammes präpariert, ähnlich bei *Sargassum*. Von der *Padina* wurden Querschnitte des blattförmigen Thallus verarbeitet.

Zuerst wurde das Verhalten der Zellen bei einer Wirkung hypertonischer Traubenzuckerlösung geprüft. Eine 2 mol-Lösung ruft in allen Fällen Krampfplasmolyse hervor, die innerhalb von 5 bis 10 Minuten zur Konkavform übergeht und später — nach 1 Stunde — werden die Protoplasten abgerundet. An allen Zellen tritt Plasmasystrophe ein. Sie muß nicht Folge der Wirkung des Plasmolytikums sein, denn sie tritt auch schon in reinem Seewasser ein, sie kann entweder an mechanische Reizung gebunden sein oder sie stellt eine Lichtsystrophe dar, wie sie auch für andere Meerespflanzen festgestellt worden ist (Diannelidis 1951).

Das Plasmalemma der Zellen aller untersuchten Arten von Phaeophyceen zeigt sich empfindlich gegen hypotonische Na_2CO_3-Lösungen (Konzentrationen von 0,5 mol, 0,25 und 0,05 mol), während es in hypertonischen Lösungen (Konzentrationen von 1 mol, 1,5 mol und 2 mol) widerstandsfähiger ist. Im ersten Fall wird das Plasmalemma innerhalb von 5 bis 10 Minuten getötet, bei folgender Plasmolyse mit Traubenzucker tritt Tonoplastenbildung ein. Im Fall stärkerer Konzentrationen bleibt es noch über drei Stunden lebend (Abb. 1).

Gegen hypertonische Kaliumoxalatlösung (2 mol) erweist sich das Plasmalemma, verglichen mit 2 mol Natriumkarbonat, widerstandsfähiger, wodurch bewiesen wird, daß nicht das Fehlen der Seesalze im Plasmolytikum die Todesursache ist.

Lösung aus 1 Teil 1 mol KOH und 9 Teilen 2 mol KNO_3 schädigt das Plasmalemma innerhalb von 15 bis 20 Minuten. Bei *Cystosira ericoides* vermindert sich diese Zeit auf 1 bis 3 Min.

Als Beispiel seien die Versuche mit Cystosiren näher beschrieben.

Cystosira barbata (Good et Wood) Ag.

An den Küsten bei Mikron Embolon und Peraia (20 km von Thessaloniki) aus einer Tiefe von 1 bis 1,5 m gesammelt. Versuche von Juni, Juli und September 1936. Tangentialschnitte durch den unteren Teil des Cauloids. Die Zellen zeigen Plasmasystrophe vor der Wirkung irgendwelchen Mediums, sie tritt nach dem Einsammeln am Standort noch im Seewasser ein, wahrscheinlich infolge der Einwirkung des Lichtes. Die Zellen enthalten mehrere Vakuolen.

Hypertonische Traubenzuckerlösung (2 mol). Zuerst tritt krampfartige Plasmolyse ein, die schnell zur konkaven übergeht. Nach 10 Minuten sind die meisten Protoplasten abgerundet.

Sodalösung. Hypertonische Lösung von 2 mol liefert sofort kugelkonvex Plasmolyse. In manchen Zellen sind die Hechtschen Fäden gut sichtbar. Bis 10 Stunden nach dem Einlegen ins Plasmolytikum bleibt die Plasmolyse erhalten, später wird das Plasmalemma durchlässig, so daß der Protoplast stirbt. Noch nach 8 Stunden sieht man in den Zellen Hechtsche Fäden.

Übertragen wir lebende plasmolysierte Zellen von der Konzentration 2 mol allmählich in schwächere Konzentrationen von Na_2CO_3, so erfolgt eine langsame Rückdehnung des Protoplasten.

In einer 1,5 mol-Lösung bleibt das Plasmalemma 8 Stunden lang resistent. Vom Moment an, wo es geschädigt wird, sterben Binnenplasma und Tonoplast. Das Binnenplasma zeigt keine Verquellung.

In einer 1 mol-Lösung widersteht das Plasmalemma dem Eintritt des Plasmolytikums etwa 20 Stunden lang.

Gegen schwächere Konzentrationen von 0,25 mol und 0,05 mol übt das Plasmalemma seine Schutzfunktion 5 bis 10 Minuten lang aus, dann tritt Nekrose ein, die bis zum Absterben des Tonoplasten fortschreitet.

Folgendes Protokoll berichtet über den zeitlichen Versuchsverlauf.

9. Juli, Zimmertemperatur 29,5° C.

9 Uhr Sammeln von frischem Material.

14 Uhr Einlegen der Schnitte in 2 mol Na_2CO_3-Lösung.

17,32 Uhr Alle Zellen normal konvex plasmolysiert. Trinkwasser, das durch das Deckglas eindringt, bewirkt volle Deplasmolyse des Protoplasten.

19,15 Uhr Alle Zellen von anderen Präparaten befinden sich in konvexer Plasmolyse. Durch Trinkwasser erfolgt Deplasmolyse.

22,15 Uhr Schnitt in einer 1 mol Na_2CO_3-Lösung seit 14 Uhr. In allen Zellen konvexförmige Plasmolyse. Ein Teil der Zellen ist deplasmolysierbar, ihr Zellsaft ist farblos. Ein anderer Teil der Zellen ist tot ohne irgendwelche Farbänderung des Zellsaftes. In einem dritten Teil der Zellen ist der Zellsaft braungelb gefärbt, wahrscheinlich wegen Eintritt von Natriumkarbonatmolekülen. Diese Zellen sind nicht deplasmolysierbar.

10. Juli.

10 Uhr Die Zellen eines Schnittes, der seit 20 Stunden in 1 mol-Natriumkarbonatlösung liegt, zeigen konvexe Plasmolyse. In der Mehrzahl der Zellen ist der Zellsaft braungelb gefärbt. Solche Zellen sind nicht deplasmolysierbar, während 10% von denen, deren Zellsaft ungefärbt geblieben ist, durch Trinkwasser langsam deplasmolysiert werden. In solchen Zellen treten nach Zerstörung des Plasmalemmas mehrere Vakuolen auf, deren Tonoplast zerplatzt.

Hypertonische Kaliumoxalatlösung. Der Protoplast benimmt sich ähnlich wie in hypertonischen Na_2CO_3-Lösungen. Das Plasmalemma resistiert über 10 Stunden. Es zeigt sich resistenter in 2 mol-Kaliumoxalatlösung als in 2 mol-Natriumkarbonatlösung (Abb. 2).

Gemischte Lösung aus 1 Teil 1 mol KOH und 9 Teilen 2 mol KNO_3. Sofort nach dem Einlegen der Schnitte in die Lösung tritt primäre Tonoplastenplasmolyse ein, und in dicken Teilen der Schnitte werden die Zellen erst kugelkonvex plasmolysiert, bald aber, nach 5 Minuten, wird das Plasmalemma zerstört und sofort erscheinen mehrere kugelige Vakuolen. Das Platzen des Plasmalemmas geschieht in den meisten Zellen nach 15 Minuten. Man darf annehmen, daß die Lebensdauer des Plasmalemmas durchschnittlich 15 bis 20 Minuten beträgt. Bei primärer Tonoplastenplasmolyse ist eine primäre Schädigung des Plasmalemmas anzunehmen.

Cystosira abrotanifolia Ag.

Von den Küsten Mikron Embolon aus 1 bis 1,5 m Tiefe. Zeit der Untersuchungen Mai— Juni. Tangentialschnitte durch den unteren Teil des Hauptstammes.

Hypertonische Traubenzuckerlösung (2 mol). Am Anfang tritt Krampfplasmolyse auf, die nach 5 bis 10 Minuten zur Konkavform übergeht. Nach 1 Stunde werden die Protoplasten konvex abgerundet. In allen Zellen Plasmasystrophe.

Sodalösung (2 mol) ruft sofort kugelkonvexe Plasmolyse der Protoplasten hervor. Hechts Fäden sichtbar. Nach 3 Stunden wird das Plasmalemma geschädigt. Plasmasystrophe. Bei Übertragung in stufenweise schwächere Konzentrationen von Na_2CO_3-Lösungen werden die Zellen deplasmolysiert.

In 1 mol-Sodalösung dasselbe Verhalten wie in 2 mol-Lösung. Die Schädigung des Plasmalemmas tritt erst nach 9 Stunden ein.

In 0,25 mol- und 0,05 mol-Sodalösung erfolgt Nekrose des Plasmalemmas 10 Minuten nach Einlegen der Schnitte in die Lösung. Ersetzt man diese durch hypertonische Traubenzuckerlösung, so wird Tonoplastenplasmolyse bewirkt. Nach 15 Minuten wird auch der Tonoplast zerstört.

Cystosira ericoides Ag.

Vom Ort Peraia bei Thessaloniki. Aus 1 m Tiefe. Zeit der Versuche September 1956. Schnitte des Hauptstammes.

Hypertonische Traubenzuckerlösung. Die anfangs krampfartige Plasmolyse geht zur Konkav- und nach 15 Minuten zur Konvexform über.

Sodalösung (2 mol). Erst tritt normale konvexe Plasmolyse ein (Abb. 3). Nach 10 Stunden persistiert noch das Plasmalemma. Bei Eintritt der Natriumkarbonatmoleküle in die Vakuole färbt sich der Zellsaft gelblich.

Gemischte Lösung aus 1 Teil 1 mol KOH und 9 Teilen 2 mol KNO_3. Das Plasmalemma überdauert 15 bis 20 Minuten lang. Der Verlauf der Erscheinungen stimmt mit denen bei *Cystosira barbata* überein. Hier sieht man klar, wie 1 bis 3 Minuten nach Schädigung des Plasmalemmas die Vakuolen erscheinen und dann bald die Tonoplasten zerplatzen.

Hypotonische Kaliumoxalatlösung. Zuerst erscheint normale Konvexplasmolyse der Protoplasten. Das Plasmalemma bleibt mehr als 6 Stunden intakt und schont den Protoplasten.

Abb. 2.

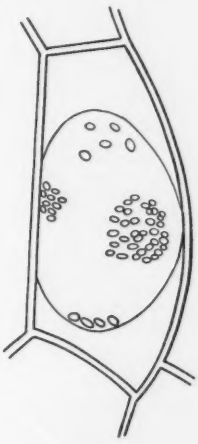


Abb. 3.

Abb. 2. *Cystosira barbata*, normale Plasmolyse in 2 mol Kaliumoxalat, 1 Stunde nach dem Einlegen ins Plasmolytikum.

Abb. 3. *Cystosira ericoides*. Zelle in 2 mol Na_2CO_3 normal plasmolysiert.

2. Rhodophyceae

Höfler war der erste, der die auffälligen plasmatischen Eigenmerkmale der Rhodophyceen beobachtete. Der eigenartige Protoplast der Rotalgen hat besonderes Interesse vom Standpunkt der vergleichenden Protoplasmatik. Viele Untersuchungen beschäftigen sich mit den Rhodophyceen (Biebl 1937, 1938, 1939, 1952, Bünning 1934, Höfler 1930, 1931, 1956 etc.).

Der ungewöhnliche Formverlauf, das Fehlen der Rundung, die schlechte Plasmolyseresistenz, die starke Adhäsion an die Zellwände sind kennzeichnend für den Rotalgen-Protoplasten; groß ist auch die allgemeine Empfindlichkeit. Bei den meisten Arten kommt der plasmolysierte Protoplast niemals zur Abrundung. Plasmastränge und Vorsprünge, die an der Zellwand zurückbleiben, werden nicht eingezogen (Höfler 1930, R. Weber 1933).

Das Haftvermögen des Protoplasten (Weber 1932) wird nicht von den auf die Rundung zielenden Oberflächenkräften überwunden. Die schlechte Plasmolyseresistenz und das starke Haftvermögen sind von besonderem Interesse für das Studium der Ausbildung des Plasmalemmas. Aus diesem starken Haftvermögen darf man nicht auf eine hohe Viskosität des Plasmas schließen. Höfler (1936) hat durch Zentrifugierungsversuche gezeigt, daß bei *Griffithsia opuntioides*, einer Zellsorte mit starkem Haftvermögen, trotzdem die Viskosität des inneren Plasmas gering sein kann.

Nach den bisherigen Angaben und den Resultaten unserer Untersuchungen können wir folgende drei Kategorien von Zellen bei Rhodophyceen unterscheiden:

1. Zellen, deren Protoplast an der Zellwand sehr fest haftet. Im hypertonischen Medium läßt sich keine äußere Plasmolyse erzielen, aber der Tonoplast verkleinert sich. Diese Kontraktion des Tonoplasten geschieht nicht, weil das Plasma verquillt (wie bei der Tonoplastenplasmolyse nach Strugger 1949), sondern weil das Haften des Plasmas an die Zellwand so fest ist, daß es eher reißt als sich lostrennt. Früher oder später folgt das Absterben des Tonoplasten. Solche Fälle sind von Höfler und von Biebl (1938) an *Heterosiphonia coccinea* und *H. plumosa* beschrieben. Hierher gehört auch die *Polysiphonia*-Gruppe.

2. Zellen, deren Protoplast nicht gleich fest an allen Teilen der Zellwand haftet, so daß im hypertonischen Medium Krampf- oder Konkavplasmolyse auftritt. Der Protoplast löst sich meist nur von kleinen Teilen der Zellwand. Später stirbt er ab. Manchmal werden vor dem Absterben Tonoplasten gebildet. Die meisten der Rhodophyceen gehören zu dieser Kategorie.

3. In wenigen Fällen haftet der Protoplast so schwach an der Zellwand fest, daß er sich mit hypertonischen Mitteln vollständig von der Wand ablöst. Solche Fälle werden bei Höfler (1931, S. 647) aufgezählt.

Gerade wegen des eigenartigen plasmolytischen Verhaltens des Protoplasten der Rhodophyceen ist hier die Untersuchung der Hautschichten schwer. Die Methode der hypertonischen Natriumkarbonatlösungen setzt eine schwache Schädigung des Protoplasten bei Plasmolyse voraus. Deswegen ist die Methode nur in Zellen der zweiten und dritten Kategorie anwendbar. Aus diesem Grund wurde immer vorher das Verhalten der Zellen der untersuchten Arten gegen hypertonische Traubenzuckerlösung untersucht. Der Traubenzucker wurde allerdings in destilliertem Wasser und nicht in Seewasser gelöst angewandt.

Untersucht worden sind die Arten *Ceramium diaphanum, Spyridia filamentosa, Gracilaria dura, Gr. compressa, Gr. confervoides, Rhytiphlaea*, sp., *Hypnaea musciformis, Acanthophora Delilei, Gigartina Teedii* und *Callithamnion* sp. — Keine dieser Arten gehört zu der oben erwähnten dritten Kategorie. In der ersten Kategorie ordnen sich *Gigartina Teedii, Gracilaria confervoides* und *Callithamnion* sp. Die übrigen gehören der zweiten Kategorie an.

Die Algen wurden aus einer Tiefe von 1,5 bis 2 m geholt. Nur die *Gracilaria*-Arten stammen aus einer Tiefe von 20 bis 30 cm.

Hypertonische Traubenzuckerlösung (1 mol, 1,5 mol und

2 mol). Die Experimente beziehen sich auf fadenförmige Arten und auf Zellen von Tangentialschnitten des Hauptstammes oder der Zweige der Gewebsalgen.

Die Zellen, deren Protoplast sehr fest an der Zellwand haftet (*Gracilaria confervoides, Gigartina, Callithamnion*), sterben rasch ab. Die übrigen untersuchten Arten, die der zweiten Kategorie angehören, bleiben lang am Leben, z. B. *Ceramium diaphanum* ist deplasmolysierbar nach zweistündiger Einwirkung des Traubenzuckers, *Spyridia filamentosa* nach 50 Minuten, *Gracilaria dura* nach 16 Stunden, *Gr. compressa* nach 10 Stunden, *Rhytiphlaea* nach 45 Minuten und *Acanthophora Delilei* nach 13 Stunden.

Natriumkarbonatlösung (2 mol, 1 mol, 0,5 mol, 0,25 mol). Das Plasmalemma des Protoplasten aller Zellen der untersuchten Rhodophyceen ist außerordentlich empfindlich gegen hyper -und hypotonische Lösungen. Wir erwähnen als Beispiel nur den Fall der Fadenalge *Ceramium diaphanum* und der Gewebsalge *Gracilaria compressa.*

Die Fäden von *Ceramium diaphanum* wurden in Fläschchen mit 1 mol Sodalösung gebracht und alsbald zur mikroskopischen Untersuchung entnommen. Das Plasmalemma der Protoplasten der großen Internodialzellen wird von der Lösung überrannt. Seiner Zerstörung folgt der Tod des Binnenplasmas. Nur wenige Zellen zeigen schwache Tonoplastenplasmolyse. Lassen wir eine 2 mol-Traubenzuckerlösung nach Vorbehandlung der Zellen mit der Na_2CO_3-Lösung 3 Minuten lang wirken, so erzielen wir allgemein typische Tonoplastenplasmolyse. Dabei zerfällt in manchen Zellen die Vakuole in zwei Teile. Schwächere Konzentrationen von 0,5 mol und 0,05 mol töten das Plasmalemma innerhalb 3 Minuten. Nach 15 bis 20 Minuten ist auch der Tonoplast getötet.

Die Zellen der Schnitte der Gewebsalge *Gracilaria compressa* (Abb. 4) verhalten sich ganz ähnlich. Hypertonische Sodalösungen von 1 mol und 2 mol rufen Nekrose der meisten Zellen hervor, so daß keine Plasmolyse eintritt. Hypotonische Lösungen (0,05 mol, 0,25 mol und 0,5 mol) töten das Plasmalemma binnen 5 bis 10 Minuten und innerhalb 10 bis 20 Minuten wird auch der Tonoplast zerstört. Nachher ist die Änderung der Farbe der abgestorbenen Plastiden deutlich.

Fadenalgen und Gewebsalgen verhalten sich ähnlich gegen Sodalösungen. Ihr Plasmalemma zeigt dieselbe Resistenz gegen hyper- und hypotonische Lösungen.

3. Chlorophyceae

Vergleichende protoplasmatische Untersuchungen an marinen Chlorophyceen sind von Höfler (1932, 1934), Biebl (1952) u. a. durchgeführt worden. Der Protoplast von *Cladophora* und *Chaetomorpha* wird durch eine große Viskosität, schwache Adhäsion zu den Zellwänden und große Durchlässigkeit für Salze des Seewassers charakterisiert. Es fehlen nicht Ausnahmen dieses Verhaltens, das Plasmolyseverhalten von *Cladophora* stellt ein eigenes Kapitel dar.

Die vorliegenden Untersuchungen erfassen drei *Cladophora*-Arten

(*C. pellucida*, *C. repens*, und *C. arcta*) und die Arten *Enteromorpha linza* und *Ulva lactuca*. Im Vorversuch wurden die Zellen mit hypertonischer Traubenzuckerlösung (2 mol) behandelt.

Cladophora-Arten

Durch hypertonische Traubenzuckerlösung erhält man die bekannten Plasmolysebilder, wie sie von Höfler (1932 a) beschrieben worden sind.

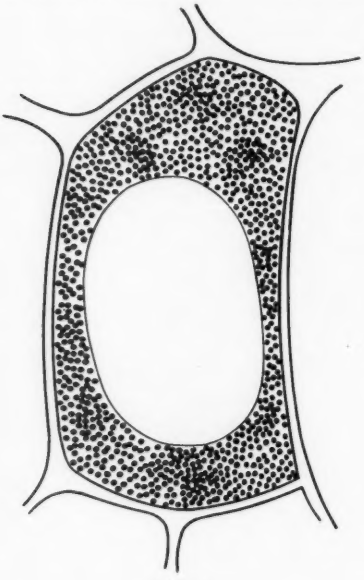


Abb. 4.

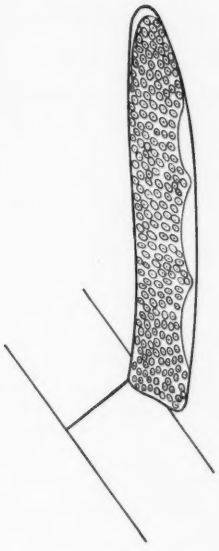


Abb. 5.

Abb. 4. *Gracilaria compressa*. Zellen nach Vorbehandlung mit 0,5 mol Na_2CO_3 zeigen in 2 mol Traubenzucker „Tonoplastenplasmolyse". Protoplast abgestorben.
Abb. 5. *Cladophora pellucida*. Normale Plasmolyse in 1 mol Na_2CO_3.

Zuerst Ablösung des Protoplasten von den Längswänden, während sie an den Querwandflächen noch unter Bildung flach konkaver Buchten haften bleiben.

Sodalösung. In hypertonischen Sodalösungen (2 mol, 1 mol) tritt sofort Plasmolyse ein. Der Protoplast wird von allen Wandseiten abgelöst. Nach 30 Minuten bis 1 Stunde wird das Plasmalemma geschädigt, und nach längerer Wirkung der Lösung stirbt der ganze Protoplast ab. Dem Tod des Plasmalemmas folgt ein vorübergehendes Tonoplastenstadium. Die einzelnen Arten verhalten sich nicht ganz gleich, sie zeigen wesentliche Unterschiede in der Resistenz ihres Plasmalemmas. Zum Beispiel bei *Cladophora pellucida* (Abb. 5) resistiert in manchen Fäden das Plasmalemma 90 Minuten und sogar in manchen Zellen bis 2 Stunden.

Hypotonische Lösung von 0,5 mol tötet das Plasmalemma innerhalb von

10 bis 15 Minuten, in solcher von 0,25 mol binnen 20 Minuten, und in einer Konzentration 0,05 mol nach 30 Minuten.

Kaliumoxalatlösung: Die Konzentration von 2 mol wirkt ganz ähnlich wie hypertonische Natriumkarbonatlösungen, nur erscheint das Plasmalemma hier widerstandsfähiger. Dieses Verhalten gewinnt an Interesse für die Frage der Beteiligung des Ca am Aufbau des Plasmalemmas (s. weiter unten).

Gemischte Lösung aus 1 Teil 1 mol KOH und 9 Teilen 2 mol KNO_3 tötet das Plasmalemma spätestens in 2 bis 3 Minuten. Der Nekroseverlauf ist nicht der gleiche an allen Zellen eines Fadens.

Fäden von *Cladophora arcta* wurden mit konzentriertem Seewasser (auf die Hälfte des Volumens eingeengt) plasmolysiert. Der Protoplast bleibt lang plasmolysiert, nach zwei Tagen geht die Plasmolyse ganz zurück. Solche deplasmolysierte Zellen reagieren in 2 mol Traubenzucker wieder mit neuer Plasmolyse.

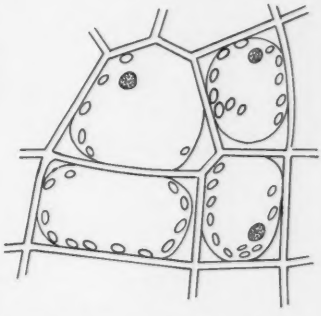


Abb. 6. *Enteromorpha Linza.* Normale Plasmolyse in 1 mol Na_2CO_3.

Enteromorpha und Ulva

Enteromorpha linza und *Ulva lactuca* (L.) Le Jol. reagieren in ähnlicher Weise.

Traubenzuckerlösung von 2 mol ruft konkave Plasmolyse hervor, die binnen 10 bis 15 Minuten in den meisten Zellen konvex wird. Einwirkung des Plasmolytikums durch längere Zeit tötet den Protoplasten.

Durch hypertonische Sodalösungen (2 mol, 1 mol) entsteht kugelkonvexe Plasmolyse (Abb. 6), der Protoplast löst sich von allen Zellwänden ab. Nach 30 Minuten stirbt das Plasmalemma ab. Fast innerhalb derselben Zeit (10 bis 30 Minuten) töten hypotonische Lösungen (0,5 mol, 0,25 mol und 0,05 mol) das Plasmalemma. Nur für wenige Zellen ist eine längere Zeit erforderlich (50 bis 60 Minuten).

Gegen 2 mol Kaliumoxalatlösung bleibt das Plasmalemma resistent. Noch eine Stunde nach dem Einlegen der Zellen ins Plasmolytikum (konkave Plasmolyse) sind sie deplasmolysiert.

Gemischte Lösung aus 1 Teil 1 mol KOH und 9 Teilen 2 mol KNO_3 gibt konvexe Plasmolyse, aber nach 1 bis 3 Minuten sind die meisten Protoplasten tot. Wenige Zellen zeigen nach dieser Zeit Tonoplastenplasmolyse.

III. Rückblick und Besprechung

Die Ausbildung der Plasmahautschichten des pflanzlichen Protoplasten hat grundlegende Bedeutung für das Verhalten der Zelle gegen verschiedene Stoffe (Intrabilität, Permeabilität). Die äußere Plasmagrenzschicht, das Plasmalemma, übt einen Schutz gegen die den Protoplasten schädigenden

Stoffe. Höfler (1951) schreibt: „Eine verschieden starke Ausbildung und eine Schutzwirkung des Plasmalemmas bei verschiedenen Zelltypen wird in ungleicher Intrabilität, und wenn plasmaschädigende Agentien einwirken, in einer unterschiedlichen Resistenz der Zellen Ausdruck finden." Nach den Untersuchungen Höflers an Zellen von Anthophyten und Süßwasseralgen ist die Resistenz verschiedener Pflanzenzellen gegen Na_2CO_3-Lösung außerordentlich verschieden. In den Zellen der Landblütenpflanzen erscheint das Plasmalemma schwach bis mäßig stark ausgebildet, bei Süßwasseralgen mäßig bis sehr stark. Besonders manche Desmidiaceen sind durch den Besitz eines besonders dicht abschließenden Plasmalemmas ausgezeichnet, während bei den begeißelten Volvocales *Eudorina* und *Chlamydomonas* und den Peridineen ein geschlossenes Plasmalemma zu fehlen scheint, da sie mit hypertonischer Sodalösung sofort getötet werden (Höfler 1951).

Es schien vom Standpunkt der vergleichenden Protoplasmatik interessant zu untersuchen, wie die Meeresalgen sich verhalten, wenn sie mit Na_2CO_3-Lösung behandelt werden. Wie gezeigt wurde, sind die verschiedenen Kategorien der Meeresalgen, Braunalgen, Rotalgen usw., durch eigenartige unterschiedliche Eigenschaften gekennzeichnet.

Arten von Phaeophyceen, Rhodophyceen und Chlorophyceen wurden mit hypertonischen und hypotonischen Sodalösungen behandelt. Vorher wurde ihr Verhalten in hypertonischer Traubenzuckerlösung überprüft.

Die Zellen der meisten untersuchten Arten der Phaeophyceen werden in hypertonischen Na_2CO_3-Lösungen normal plasmolysiert, d. h., der Protoplast löst sich von der Zellwand ab und nach einem Stadium von Krampfplasmolyse rundet er sich ab. Die plasmolysierten Zellen bleiben, je nach der Art, verschieden lang am Leben, höchstens aber bis 10 Stunden. Ein dichtes Plasmalemma verwehrt anfangs den Zutritt der schädigenden Lösung ins Binnenplasma. Für die Arten *Cystosira barbata* und *C. ericoides* reicht diese Zeit bis 10 Stunden, für *C. abrotanifolia* 3 Stunden und für *Sargassum linifolium* 90 Minuten. Die Zellen von *Padina pavonia* sind sehr empfindlich, mit nur 10 Minuten Resistenz. Nachher dringt die Sodalösung durch das Plasmalemma ins Binnenplasma ein und die Zellen sterben ab.

Unterwirft man die Zellen derselben Algen der Wirkung hypotonischer Sodalösungen (0,5 mol, 0,25 mol und 0,05 mol), so bekommt man das überraschende Ergebnis der Zerstörung des Plasmalemmas innerhalb von 5 bis 10 Minuten. Der Nekrose folgt ein sekundäres Tonoplastenplasmolyse-Stadium. Nach 15 Minuten wird auch der Tonoplast zerstört.

Höfler (1932b), Chalaupka (1939), Biebl (1938) haben durch Plasmolyse mit eingeengtem Seewasser gezeigt, daß der Protoplast der Braunalgen wenig durchlässig gegen Salze des Seewassers ist. Das Verhalten des Protoplasten der Phaeophyceen gegen hypertonische Sodalösungen läßt die Undurchlässigkeit für Salze am ehesten mit der Ausbildung des Plasmalemmas erklären, d. h., diese Salze finden beim Eindringen den Hauptwiderstand an der äußeren Plasmagrenzschicht.

Die Zellen der untersuchten Rhodophyceen sind äußerst empfindlich gegen Sodalösungen. Durch hypertonische Traubenzuckerlösung lassen sie sich plasmolysieren und bleiben lang am Leben (*Ceramium diaphanum*

über 2 Stunden, *Spyridia filamentosa* über 50 Minuten, *Gracilaria dura* über 16 Stunden, *Gr. compressa* über 10 Stunden, *Rhytiphlaea* mehr als 45 Minuten und *Acanthophora Delilei* 13 Stunden). Die Protoplasten lösten sich teilweise von der Zellwand ab. Für solche Zellen müssen wir eine schwache Plasmolyseschädigung annehmen. Die Untersuchungen Höflers (1936) an Rhodophyceen haben zu der Annahme geführt, daß die Konstitution der äußeren Plasmaschichten und die Art der Verbindung von Protoplast und Zellmembran die hohe Plasmolyseempfindlichkeit der Rotalgenzelle bedingt (vgl. auch Bünning 1934).

Durch hypertonische Sodalösungen (2 mol, 1,5 mol, 1 mol) tritt sofort Tonoplastenplasmolyse ein, die 15 bis 20 Minuten dauert. Die Lösung zerstört sofort das Plasmalemma, es bietet keinen Widerstand mehr, so daß das Binnenplasma bis an den Tonoplasten stirbt. Selbst der Tonoplast überlebt nicht länger als 5 Minuten.

Die Wirkung hypotonischer Sodalösungen schädigt das Plasmalemma nach 3 bis 5 Minuten. Es folgt Tonoplastenplasmolyse und nach 15 bis 20 Minuten stirbt auch der Tonoplast.

Die obigen Beobachtungen über die Wirkung der Sodalösung auf den Protoplasten der Rotalgen stehen in Übereinstimmung mit den allgemeinen Eigenschaften der Zellen der Rhodophyceen, für die eine sehr große Empfindlichkeit festgestellt worden ist. Für diese Empfindlichkeit wird einerseits das Haftvermögen des Plasmas an die Zellwand und anderseits die Konstitution der äußeren Hautschicht verantwortlich sein. Die schädigende Sodalösung wirkt sofort tödlich, so daß der Schutz eines dichten Plasmalemmas fehlen dürfte. Biebl (1937) hat durch Plasmolyse mit konzentriertem Seewasser gezeigt, daß der Tonoplast der von ihm untersuchten Rhodophyceen widerstandsfähiger ist als ihr Plasmalemma. Viele der hier untersuchten Arten zeigen einen Tonoplasten, der resistenter ist als das Plasmalemma. Der Tonoplast überlebt das Plasmalemma um etliche Zeit.

Der Protoplast der geprüften Chlorophyceen ist durch die schwache Adhäsion an der Zellwand gekennzeichnet. Trotzdem das Plasmolyseverhalten von *Cladophora, Valonia, Chara* u. a. ein eigenes Kapitel darstellt (vgl. Jost 1929, Höfler 1932, Cholnoky 1931), können wir auf Grund der bisherigen Untersuchungen eine große Plasmolyseresistenz für die Chlorophyceen annehmen. Beim Plasmolyseeintritt scheint die Verletzung des Plasmalemmas gering zu sein.

Die untersuchten *Cladophora*-Arten in hypertonischen Sodalösungen zeigen kleinere Resistenz im Vergleich zu den plasmolyseresistenten *Phaeophyceen.* Das Plasmalemma der untersuchten *Cladophora*-Protoplasten verwehrt den Eintritt der Sodalösung 1 bis 1½ Stunden lang. Am Anfang tritt normale Plasmolyse ein und nach Schädigung des Plasmalemmas folgt ein kurzes Tonoplastenplasmolysestadium, dann stirbt der ganze Protoplast ab. *Ulva lactuca* und *Enteromorpha linza* besitzen ein weniger resistentes Plasmalemma. Der Protoplast stirbt innerhalb von 20 bis 30 Minuten nach Einlegen der Zellen in die Sodalösung. Hypotonische Lösungen wirken schädlich auf das Plasmalemma innerhalb von 10 bis 30 Minuten, je nach der Art und der Konzentration der Lösung.

Überprüft man die Resistenzgrenzen des Plasmalemmas an Zellen der Phaeophyceen, Rhodophyceen und Chlorophyceen, so stellt man fest, daß sie eine Abstufung zeigen. Die Phaeophyceen sind durch den Besitz eines besonders starken, dicht abschließenden Plasmalemmas ausgezeichnet. Das Plasmalemma der Rhodophyceen ist ganz schwach ausgebildet, während das der Chlorophyceen eine Mittelstellung zwischen dem der Phaeophyceen und Rhodophyceen einnimmt, indem seine Resistenz einen Zwischengrad gegenüber den Phaeophyceen und Rhodophyceen zeigt.

Der größte Teil des Materials wurde im Sommer und ein Teil derselben Arten im Herbst untersucht (Sommertemperaturen etwa 30° C, Herbsttemperaturen etwa 15—16° C). Weber (1932) hat an *Helodea* beobachtet, daß das Plasmalemma durch Kälte bei Plasmolyse besonders stark geschädigt wird. Biebls (1938 a) Untersuchungen an *Heterosiphonia plumosa* zeigten eine Steigerung der Lebensfähigkeit des Plasmalemmas in hoher Temperatur (+ 26° C), die aber Biebl nicht als Ursache für die Deutung der Tonoplastenbildung in den Zellen von *Heterosiphonia plumosa* annimmt; er vermutet, daß die Viskositätsänderung des Plasmas mit dieser Lebensfähigkeit zusammenhängt.

Die Resistenz des Plasmalemmas gegen Na_2CO_3-Lösung bei den untersuchten Algen zeigt nun keine Abhängigkeit von der Temperatur. Wenn wir die Verhältnisse bei *Gracilaria dura, Gr. compressa* und *Gr. confervoides* betrachten, so stellen wir fest, daß bei *Gr. dura* und *Gr. compressa* unter 30° C das Plasmalemma durch hypertonische Natriumkarbonatlösung sofort geschädigt wird, was bei *Gr. confervoides* schon bei einer Temperatur von 17—18° C geschieht. Die Frage bedarf einer näheren Untersuchung, aber es scheint nicht, daß es die äußeren Verhältnisse sind, die die Resistenz des Plasmalemmas bestimmen, sondern maßgebend ist hauptsächlich die Konstitution des Protoplasten.

Es muß hervorgehoben werden, daß die Resistenzgrenzen in hypotonischen Na_2CO_3-Lösungen niedrig sind. Der Protoplast stirbt in kürzerer Zeit in schwachen Lösungen (0,5 mol, 0,25 mol, 0,05 mol) als in hypertonischen Lösungen (2 mol, 1,5 mol, 1 mol). Aus verschiedenen Arbeiten (Iljin 1935, Url 1957 und der dort angegebenen Literatur) ist hervorgegangen, daß in verschiedenen konzentrationsgestuften Lösungsreihen verschiedener Metallsalze und anderer schädigender Stoffe „Todeszonen auftreten" (Url 1957). In den niedersten Konzentrationen leben die Zellen, sie sterben im mittleren Konzentrationsbereich ab, aber in relativ hohen Konzentrationen bleiben sie wieder am Leben. Höfler (1951) stellt in seinen Plasmolyseuntersuchungen mit Natriumkarbonat an Gewebszellen fest, daß nicht nur hypertonische, sondern auch hypotonische Sodalösungen das Plasma bis an die Vakuolenwand töten.

Die Tatsache der raschen Zerstörung des Plasmalemmas und der schnellen Abtötung der Zellen der untersuchten Meeresalgen durch hypotonische Sodalösungen und ihre längere Resistenz in hypertonischen Lösungen gewinnt durch folgende Überlegung an Interesse.

Höfler (1951) nimmt an, daß die Widerstandsfähigkeit gegen einen

Stoff zweierlei Ursachen haben kann. Entweder ist das Plasmalemma für ihn undurchlässig oder der Stoff dringt ins Binnenplasma ein, aber dieses ist resistent. In den Fällen, wo niedrige hypotonische Konzentrationen tödlich wirken, dringt der Stoff ins Plasma ein und dieses hat keine Resistenz gegen den Stoff. Nach einem sehr kurzen Tonoplastenstadium stirbt der Protoplast bis zum Tonoplasten ab. Im Gegensatz dazu verwehrt das Plasma in hypertonischen Konzentrationen eine Zeit lang das Eindringen des Natriumkarbonates.

Ist diese Undurchlässigkeit des Plasmalemmas von vornherein gegeben oder bildet sie sich erst unter der Wirkung des hypertonischen, plasmolysierenden Stoffes (vgl. Biebl und Rossi-Pillhofer 1954)? Nach Kaho (1933) erzeugen Schwermetalle bei Berührung mit dem Plasma auf seiner Oberfläche eine Schutzschicht als eine „irreversibel koagulierte Oberflächenschicht", welche den Salzen ein weiteres Eindringen ins Binnenplasma verwehrt.

Die Tatsache der stärkeren Resistenz des Plasmalemmas in hypertonischen Konzentrationen führt zur Frage nach der Existenz eines von vornherein starken, schützenden Plasmalemmas, wie es Höfler fordert. Oder sollte jene mit der Wirkung der stärkeren Konzentrationen der Lösungen zusammenhängen? Im letzten Fall wäre anzunehmen, daß die Verstärkung des Plasmalemmas nicht im gleichen Maß bei den verschiedenen Algengruppen auftritt. Am stärksten erfolgte sie bei den Phaeophyceen und fast gar nicht bei den Rhodophyceen. Das Fehlen eines dicht abschließenden Plasmalemmas bei den Rhodophyceen könnte demnach als Ursache haben sowohl die Bildung einer neuen, nur sehr schwachen Grenzschicht durch die Lösung wie auch das Zerreißen eines vorhandenen Plasmalemmas durch die Plasmolyse. Wiewohl die Frage nicht so einfach erscheint, ist offenbar, daß für die Art des Reagierens und das Verhalten der untersuchten Arten jeder Gruppe die Konstitution des Plasmas und des Plasmalemmas die Hauptrolle spielt. Dafür spricht auch das Verhalten ihrer Zellen gegen Kalilauge.

Zelle von *Cystosira barbata* und *C. ericoides* sind in einer Lösung von 1 Teil 1 mol KOH und 9 Teilen 2 mol KNO_3 einigermaßen widerstandsfähig. In einer solchen Lösung tritt erst normale Plasmolyse ein, dann zerplatzt das Plasmalemma und mehrere Kugelvakuolen treten auf (sekundäre Tonoplastenplasmolyse).

Das Plasmalemma von *Cladophora*, *Enteromorpha* und *Ulva* ist empfindlicher gegen Kalilauge. Nach Cholnokys Untersuchungen an Blumenblattzellen mit KOH werden durch Verseifung Hautschichten, in welchen die lipoiden Phasen dominieren, schneller, und solche, in welchen Eiweißphasen die größte Rolle spielen, langsamer zerstört. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit KOH an den untersuchten Chlorophyceen würden in diesem Sinne ein Plasmalemma andeuten, in welchem die lipoiden Phasen dominieren, während bei den Phaeophyceen diese Phasen nicht vorherrschen.

Ein weiteres Zeichen der verschiedenen Konstitution des Plasmalemmas bei den untersuchten Arten ist ihr Verhalten gegen Kaliumoxalat. Behandelt man Zellen mit Kaliumoxalat und plasmolysiert sie mit

hypertonischen Harnstoff- oder Traubenzuckerlösungen, Glyzerin usw., d. h. indifferenten Ca-freien Lösungen, so erzielt man eine primäre Tonoplastenplasmolyse (Weber 1932, 1934). Bekanntlich wird die letale Wirkung auf das Plasma verursacht durch die mangelnde Restitution des Plasmalemmas nach dem Plasmolyseeingriff, wenn durch das Oxalat alles Kalzium der Grenzschicht gebunden worden ist. Untersuchungen von Weber (1931, 1933) an *Spirogyra* und *Ranunculus* haben gezeigt, daß dort das Ca für die Restitution des Plasmalemmas nötig ist. Fehlt es, so wird die normale Plasmolysierbarkeit vernichtet. Höfler (1931) erhielt mit Natriumkarbonat ähnliche Tonoplastenplasmolyse wie Weber nach Vorbehandlung mit Kaliumoxalat. Die plasmolysierende Sodalösung schädigt das Plasmalemma der pflanzlichen Gewebszellen durch Störung des Salzgleichgewichtes und Entfernung des Ca, was dann in der Überschwemmung des Binnenplasmas zum Ausdruck kommt und zur Tonoplastenplasmolyse führt.

Parallelversuche mit Na_2CO_3- und Kaliumoxalatlösungen an dem von uns untersuchten Material zeigten keine Störung der Plasmolysierbarkeit. Dieses Verhalten führt zu der Annahme, daß das Ca wahrscheinlich nicht nötig zum Aufbau des Plasmalemmas der untersuchten Phaeophyceen und Chlorophyceen ist.

Biebl (1947—1952) unterscheidet in seinen Untersuchungen über die Resistenz des pflanzlichen Protoplasten umweltbedingte „ökologische Resistenz" und nicht umweltbezogene „konstitutionelle Resistenz". Als ökologische Resistenz bezeichnet Biebl die in Anpassung an die Erfordernisse des Standortes, etwa gegen Austrocknung, Versalzung oder Aussüßung, gegen Kälte oder Hitze, bei allen Besiedlern eines Lebensraumes auftretenden Resistenzen. Sie sind im wesentlichen erbmäßig für die einzelnen Arten, also konstitutionell, aber unterliegen gewissen Schwankungen in Abhängigkeit von den Außenbedingungen. Die nicht umweltbezogene konstitutionelle Resistenz stellt die Resistenz des Protoplasmas gegen Stoffe oder Einflüsse dar, die in der Natur nie in solcher Stärke vorkommen, daß eine besondere Resistenz gegen sie für das Leben der Pflanze von Bedeutung werden könnte. Diese Resistenz ist von den äußeren Einflüssen unabhängig und somit geeignet für die Kennzeichnung verschiedener Plasmasorten. Für die Meeresalgen unterscheidet Biebl drei in ihren Resistenzeigenschaften ähnliche ökologische Gruppen: 1. Algen der Gezeitenzone, die bei Ebbe gelegentlich vollkommen frei liegen, 2. Algen der Ebbelinie und der Gezeitentümpel und 3. ständig submerse Tiefenalgen. Die von uns untersuchten Algen gehören zu den ständig submersen Tiefenalgen. Fundorte von 1 bis 1,5 m Tiefe entsprechen im östlichen Mittelmeer mit seinen geringen Gezeitenschwankungen der ständig submersen Zone. Die ökologischen Verhältnisse sind für sie ähnlich, so daß die Resistenz gegen KOH und Na_2CO_3 sich nicht auf umweltbezogene Resistenz beziehen kann. Daß die von uns untersuchten Phaeophyceen, Rhodophyceen und Chlorophyceen eine Resistenz verschiedenen Grades gegen Na_2CO_3 und KOH zeigen, kann nur als Ausdruck unterschiedlicher Konstitution des Plasmas der drei Algengruppen verstanden werden.

Zusammenfassung

Die Resistenz verschiedener Zellsorten gegen Sodalösung gibt uns ein Maß zur Schätzung der Stärke ihres Plasmalemmas. In der vorliegenden Arbeit wurde die Ausbildung des Plasmalemmas der Protoplasten von Meeresalgen untersucht. Gleichzeitig wurde durch die Wirkung von KOH, das die lipoiden Phasen des Plasmas verseift, der Grad der Teilnahme lipoider Phasen am Aufbau des Tonoplasten und des Plasmalemmas untersucht. Weiter wurde durch Behandlung mit Soda- und Kaliumoxalatlösungen geprüft, wieweit das Ca entscheidend an der Bildung des Plasmalemmas beteiligt ist.

Untersucht wurden Arten von Phaeophyceen, Rhodophyceen und Chlorophyceen. Der Protoplast der geprüften Gewebszellen höherer Phaeophyceen (*Cystosiren, Sargassum, Padina)* besitzt ein stark ausgebildetes Plasmalemma im Gegensatz zu den Rhodophyceen, deren Plasmalemma sehr schwach und empfindlich ist. Die Chlorophyceen nehmen mit einem mäßig starken Plasmalemma eine Mittelstellung zwischen den zwei Gruppen ein.

Gegen Kalilauge zeigt sich das Plasmalemma der Phaeophyceen relativ widerstandsfähig, im Gegensatz zum empfindlichen Plasmalemma der Chlorophyceen.

Die Wirkung des Kaliumoxalates wurde an Phaeophyceen und Chlorophyceen, die sich gut plasmolysieren lassen, geprüft. Das Plasmalemma dieser Arten wird durch Kaliumoxalat nicht zerstört, dies deutet vermutlich auf keine entscheidende Beteiligung des Ca an ihrem Plasmalemma hin.

Die festgestellten Unterschiede zwischen Phaeophyceen-, Rhodophyceen- und Chlorophyceenprotoplasten, die unter ähnlichen ökologischen Verhältnissen leben, sind wohl der Ausdruck konstitutioneller Unterschiede der Grenzschichten. Das Plasmalemma zeigt wechselnde Ausbildung mit einer abgestuften Schutzfunktion gegenüber wasserlöslichen, das Binnenplasma schädigenden Stoffen.

Literatur

Biebl, R., 1937 a: Ökologische und zellphysiologische Studien an Rotalgen der englischen Südküste. Beih. Bot. Cbl. *51*, A, 381.

— 1937 b: Zur protoplasmatischen Anatomie der Rotalgen. Protoplasma *28*, 562.

— 1938 a: Tonoplastenbildung bei *Heterosiphonia plumosa* Batt. Protoplasma *30*, 570.

— 1938 b: Zur Frage der Salzpermeabilität bei Braunalgen. Protoplasma *31*, 518.

— 1939: Zellphysiologische Studien an *Antithamnium plumula* (Ell.) Thuret. Protoplasma *32*, 443.

— 1949: Vergleichende chemische Resistenzstudien an pflanzlichen Plasmen. Über „ökologische" und „konstitutionelle" Resistenzen. Protoplasma *39*, 1.

— 1952: Resistenz der Meeresalgen gegen sichtbares Licht und gegen kurzwellige UV-Strahlen. Protoplasma *41*, 353.

— 1952: Ecological and non-environmental constitutional resistance of the protoplasm of marine algae. J. mar. Biol. Ass. Un. Kingd. *31*, 307.

— und W. Rossi-Pillhofer, 1954: Die Änderung der chemischen Resistenz pflanzlicher Plasmen mit dem Entwicklungszustand. Protoplasma *44*, 113.

Bünning, E., 1934: Zellphysiologische Studien an Meeresalgen. Protoplasma *22*, 144.

Chalaupka, I., 1939: Permeabilitätsstudien an Meeresalgen, vornehmlich an Braunalgen. Thalassia 3, Nr. 5, 1.

Chambers, R., and K. Höfler, 1931: Micrurgical studies on the Tonoplast of *Allium cepa*. Protoplasma *12*, 338.

Cholnoky, B. J., 1931: Untersuchungen über den Plasmolyseort der Algenzellen. IV. Die Plasmolyse der Gattung *Oedogonium*. Protoplasma *12*, 310.

— 1952: Beobachtungen über die Wirkung der Kalilauge auf das Protoplasma. Protoplasma *41*, 57.

Collander, R., 1935: Permeabilität. Im Handwörterbuch d. Naturwiss. *7*, 804, 2. Aufl. G. Fischer, Jena.

— und H. Bärlund, 1933: Permeabilitätsstudien an *Chara ceratophylla*. II. Die Permeabilität für Nichtelektrolyte. Acta Bot. Fennica *11*, 1.

Davson, H., and J. F. Danielli, 1952: The permeability of natural membranes. Cambridge.

Diannelidis, Th., 1951: Zur protoplasmatischen Anatomie des Blattes von *Halophila stipulacea*. Phyton *3*, 29.

Frey-Wyssling, A., 1938: Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate. Protoplasma-Monographien *15*, Berlin.

— 1948: Submicroscopic morphology of protoplasm and its derivatives. Elsevier publ. comp. New York, London.

Höfler, K., 1930: Das Plasmolyseverhalten der Rotalgen. Z. Bot. *23*, 570.

— 1931: Das Permeabilitätsproblem und seine anatomischen Grundlagen. Ber. dtsch. bot. Ges. *49*, 79.

— 1931: Hypotonietod und osmotische Resistenz einiger Rotalgen. Öst. Bot. Z. *80*, 51.

— 1932a: Plasmolyseformen bei *Chaetomorpha* und *Cladophora*. Protoplasma *16*, 189.

— 1932b: Vergleichende Protoplasmatik. Ber. dtsch. bot. Ges. *50*, 53.

— 1934: Kappenplasmolyse und Salzpermeabilität. Z. wiss. Mikroskop. mikroskop. Techn. *51*, 70.

— 1936: Vertragen Rotalgen das Zentrifugieren? Protoplasma *26*, 377.

— 1951: Plasmolyse mit Natriumkarbonat. Zur Frage des Plasmalemmas bei Süßwasseralgen und bei Gewebszellen von Landblütenpflanzen. Protoplasma *40*, 426.

— 1953: Zur Kenntnis der Plasmahautschichten. Ber. dtsch. bot. Ges. *65*, 391.

— 1956: Über Plastiden und Blasenzellen der Rotalgen. Pubbl. Staz. Zool. Napoli *28*, 255.

Iljin, W. S., 1935: Das Absterben der Pflanzenzellen in reinen und balancierten Salzlösungen. Protoplasma *24*, 409.

Jost, L., 1929: Einige physikalische Eigenschaften des Protoplasten von *Valonia* und *Chara*. Protoplasma *7*, 1.

Kaho, H., 1933: Das Verhalten der Pflanzenzellen gegen Schwermetallsalze. Planta *18*, 664.

Lepeschkin, W. W., 1938: Kolloidchemie des Protoplasmas. 2. Aufl. Wiss. Forschungsberichte *47*, Dresden und Leipzig.

Overton, E., 1899: Über die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen- und Thierzelle. Vjschr. Naturforsch. Ges. in Zürich, H. II.

— 1900: Studien über die Aufnahme der Anilinfarben durch die lebende Zelle. Jb. wiss. Bot. *34*, 669.

Plowe, J. Q., 1931a: Membranes in the plant cell. I. Morphological membranes at protoplasmic surfaces. Protoplasma *12*, 196.

Plowe, J. Q., 1931 b: Membranes in the plant cell. II. Localization of differential permeability in the plant protoplast. Protoplasma *12*, 221.

Ruhland, W., 1912: Studien über die Aufnahme von Kolloiden durch die pflanzliche Plasmahaut. Jb. wiss. Bot. *51*, 376.

Seifriz, W., 1936: Protoplasm. Philadelphia.

Strugger, S., 1938: Die Vitalfärbung des Protoplasmas mit Rhodamin B und 6G. Protoplasma *30*, 85.

— 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg. Springer-Verlag.

Url, W., 1957: Zur Kenntnis der Todeszonen im konzentrationsgestuften Resistenzversuch. Physiol. Plantarum *10*, 318.

Weber, Fr., 1931: Plasmolysepermeabilität bei Kälte. Protoplasma *15*, 517.

— 1932: Plasmolyse und „Surface precipitation reaction". Protoplasma *15*, 522.

— 1933: Alkoholresistenz ungleich alter *Spirogyra*-Zellen. Protoplasma *20*, 15.

— 1934: Plasmalemmazerstörung und Tonoplastenbildung. Protoplasma *21*, 424.

Weber, R., 1933: Plasmolyse und Vakuolenkontraktion bei *Antithamnion plumula*. Protoplasma *19*, 242.

Beziehungen zwischen der Größe von Chloroplasten und ihrem Gehalt an löslichen Eiweißen und Zuckern im Zusammenhang mit dem Frostresistenzproblem

Von

U. Heber

Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. H. Ullrich)

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. September 1958)

Bei der Untersuchung der Ursachen der Frostresistenz ist bisher — wohl hauptsächlich aus methodischen Gründen — die strukturelle Komplexizität der Zelle außer acht gelassen worden. Man hat in aller Regel den Gehalt von ganzen Zellverbänden an einzelnen Stoffen oder Stoffgruppen ermittelt und Vergleiche zur Frostresistenz angestellt, um daraus ursächliche Beziehungen ableiten zu können. Insbesondere wurde der Zuckergehalt in Beziehung zur Frostresistenz intensiv untersucht, da man anfänglich glaubte, daß die Frostresistenz durch Zuckeranhäufung bedingt sei (Müller-Thurgau 1882, Åkerman 1927, Andersson 1944 u. a.). Im Zellsaft angehäufter Zucker sollte über die Gefrierpunktserniedrigung die Menge des bei einer bestimmten Temperatur ausfrierbaren Wassers reduzieren, wodurch der Zelle der zum Überleben erforderliche Hydratationsgrad erhalten bliebe. Später ging man von der Ansicht, daß Zucker am Resistenzerwerb ursächlich beteiligt sind, weitgehend ab (Pisek 1953, Kessler 1955, Levitt 1956), doch ist das Problem neuerdings wieder aufgegriffen worden (Heber 1958). Einzig und allein mit der Plasmaviskosität wurde eine strukturelle Komponente in Beziehung zur Frostresistenz untersucht (Kessler 1955, Kessler und Ruhland 1958), doch ergaben sich Widersprüche (Scarth und Levitt 1957, Levitt und Siminovitch 1940) und die Verhältnisse sind keineswegs klar, zumal auch bei einer festgestellten Beziehung zwischen Frostresistenz und Plasmaviskosität über die tieferen Ursachen der Resistenz nichts ausgesagt ist.

Bei unseren Untersuchungen über Frostresistenz haben wir nun beobachtet, daß eine bestimmte Fraktion der Plasmaeiweiße, die sich durch frak-

tioniertes Zentrifugieren isolieren läßt, infolge des Wasserentzuges beim Einfrieren der Lösung koaguliert und ausfällt. Durch Zusatz von Zuckern oder ganz bestimmten Proteinen läßt sich diese Frostfällung verhindern. Eine ins einzelnere gehende Durcharbeitung ergab, daß die Schutzstoffe — Zucker oder Proteine — nur in direkter Wechselwirkung mit den empfindlichen Eiweißen schützend gegen deren Frostdenaturierung wirken können (Ullrich und Heber 1958). Daraus lassen sich für das gesamte Frostresistenzproblem interessante Folgerungen ableiten: Sofern der Gefrierversuch mit der Eiweißlösung ganz grob dem Einfrieren der Pflanzenzelle vergleichbar ist, so muß auch in der Zelle ein direkter Kontakt von Schutzstoff und zu schützendem Protein vonnöten sein, damit eine Frostresistenz zustande kommt. Wenn aber ein solcher Kontakt erforderlich ist, müssen notwendigerweise die Schutzstoffe im Plasma lokalisiert sein, denn im Plasma finden sich die frostempfindlichen Eiweiße. Es liegt also nahe anzunehmen, daß es nur auf den Schutzstoffgehalt des Plasmas ankommt. Im Plasma können aber ganz andere Verhältnisse herrschen als im Durchschnitt der gesamten Zelle, den bisher jede Analyse wiedergibt: Bei der Analyse erfaßt man ja alle Inhaltsstoffe einschließlich der der Vakuole, die wenigstens bei ausdifferenzierten Zellen bedeutend mehr Raum einnimmt als das Plasma (Butler 1953). Die Inhaltsstoffe der Vakuole dürften aber nach dem obigen Versuch, wenn überhaupt, nur wenig Einfluß auf die Ausbildung der Frostresistenz haben. Wenn also bei der Frosthärtung beispielsweise keine strenge Übereinstimmung zwischen Gesamtzuckergehalt und Resistenz beobachtet wird, so kann im Plasma eine solche Übereinstimmung doch durchaus vorliegen, sie kann aber durch die Verhältnisse in der Vakuole verdeckt werden.

Aus diesen Überlegungen ergaben sich für uns folgende Forderungen: Es war nachzuprüfen, ob die Verhältnisse unseres Modellversuches auch auf die Pflanze übertragen werden können. Wir mußten also festzustellen versuchen, ob im Plasma — dort, wo die empfindlichen Eiweiße lokalisiert sind — tatsächlich Schutzstoffe, insbesondere Zucker, in größerer Menge angehäuft sind. Weiter war dann zu prüfen, ob der Gehalt des Plasmas an diesen Stoffen in direktem Zusammenhang mit der Frostresistenz steht.

Methodik

1. Objekt

Weizenpflanzen der Sorten Criewener 192 und Hauters' II wurden bei etwa 14° C 14 Tage angezogen und dann im Kühlraum bei Temperaturen um 0° C gehärtet. Tagsüber erfolgte Beleuchtung mit HNI- und HNG-Lampen der Firma Osram in 80 cm Entfernung von den Pflanzen. Nach der Frosthärtung wurden die Pflanzen im Gewächshaus wieder bei etwa 14° C enthärtet.

Teilweise kamen auch Weizenpflanzen zur Untersuchung, die auf dem Felde gewachsen und somit natürlichen Resistenzbedingungen ausgesetzt waren. Die Untersuchung erfolgte dabei im Frühjahr, als die Frostresistenz im Abnehmen begriffen war.

2. Mikroskopische Untersuchungen

In verschiedenen Zeitabständen wurden Größenmessungen an den Chloroplasten durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden vom zweiten oder bei älteren Pflanzen vom dritten Blatt zwei bis drei Zentimeter unter der Spitze Handschnitte angefertigt. An den Querschnitten wurden bei 1200facher Vergrößerung mit dem Okularmikrometer je 100 Chloroplasten ausgemessen, und zwar jeweils zur Hälfte aus dem Palisadenparenchym und aus dem Schwammparenchym (siehe auch Ullrich 1924). Messungen wurden sowohl am größten als auch am kleinsten Durchmesser der Chloroplasten vorgenommen. Zur direkten vergleichenden Auswertung fanden nach Ullrich (1924) nur die größten Durchmesser Verwendung. Die kleinen Achsen der als Rotationsellipsoid betrachteten Chloroplasten wurden lediglich zur Kontrolle und zur näherungsweisen Berechnung der Volumverhältnisse benutzt. Die Reproduzierbarkeit der aus 100 Messungen gewonnenen Durchschnittswerte war bei den großen Achsen recht gut, während bei den kleinen Achsen nicht zu vernächlässigende Abweichungen der Messungen voneinander auftraten. Die Ergebnisse der Messungen wurden statistisch gesichert. Das erwies sich als notwendig, da die Schwankungen innerhalb der Chloroplastengrößen ganz beträchtlich waren. So schwankten die Durchmesser der Chloroplasten im Zustand der höchsten Frostresistenz zwischen 4,5 (niedrigster Wert) und 7,5 (höchster Wert) Okularmikrometereinheiten, im Zustand der Frostempfindlichkeit zwischen 2,3 (niedrigster Wert) und 6,2 (höchster Wert) Einheiten. Die Größenwerte der Chloroplasten von 100 Messungen ließen sich etwa in eine Gaußsche Fehlerkurve einordnen. Die Unterschiede zwischen den Messungen bei verschiedenen Resistenzgraden beruhten immer auf einer echten Differenz bei 1% Irrtumswahrscheinlichkeit. Die Volumenberechnungen wurden jetzt unter Zugrundelegung der Mittelwerte von großer und kleiner Achse unter der Annahme erhalten, daß die Chloroplasten Rotationsellipsoide sind.

Am selben Pflanzenmaterial, an dem die Messungen erfolgten, wurden auch Zucker- und Frostresistenzbestimmungen durchgeführt, um die erhaltenen Ergebnisse miteinander vergleichen zu können.

3. Chloroplastenisolierungen

Chloroplasten wurden auf zweierlei Weise erhalten:

a) Durch kurzzeitiges Homogenisieren von zerschnittenen Blättern im wäßrigen, gepufferten Milieu wurden Chloroplasten freigelegt und durch fraktioniertes Zentrifugieren isoliert. Als Homogenisationsmedium diente 0,5 m Mannit (Leuthart und Müller 1948) in Phosphatpuffer von pH 7,4. Der pH-Wert durfte beim Homogenisieren nicht unter 6,8 sinken, da dann Denaturierung und Verklumpung eintrat.

b) Blätter wurden bei -70^{0} C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. In einer Modifikation des von Behrens (1938) für Zellkerne von Leber angegebenen Verfahrens wurden Chloroplasten isoliert, indem das getrocknete Material in Petroläther/Tetrachlorkohlenstoff zerschlagen und anschließend bei unterschiedlichen Dichten des Suspensionsmediums

zentrifugiert wurde. Nähere Einzelheiten des Verfahrens sind an anderer Stelle mitgeteilt worden (Heber 1957).

Es soll hier noch die Frage nach der Reinheit der nach Gefriertrocknung isolierten Chloroplasten gestellt werden. Als Verunreinigung kommen neben Zellkernen wohl hauptsächlich Zellwandfragmente in Frage. Die Zellkerne ließen sich leider nicht vollständig von den Chloroplasten abtrennen, doch dürfte der Gehalt an Kernen nicht über 1 bis 2% liegen, wie aus dem mikroskopischen Befund hervorging. Bei sorgfältiger Reinigung waren hingegen Zellwandfragmente mikroskopisch nicht mehr festzustellen. Weiteren Aufschluß konnte der Gehalt der Chloroplasten an unlöslichen Zuckern geben, die möglicherweise aus Zellwandverunreinigungen stammen könnten. Der Gehalt an unlöslichen Zuckern schwankte bei einzelnen Isolierungen zwischen 3,7 und maximal 8,5% des Chloroplastengewichtes (Anthronmethode, Morris 1948). Hydrolyseversuche bei 100° C ergaben, daß über 80% dieser Zucker durch 1½ n H_2SO_4 in 35 Minuten freigelegt werden. Sie können also nicht aus Zellulosebestandteilen stammen, wie im übrigen auch aus ihrer Zusammensetzung ersichtlich ist: Es wurden neben Galaktose und Ribose mehr Arabinose und Xylose als Glukose im Hydrolysat gefunden. Schließlich ergab auch die auf andere Weise vorgenommene Untersuchung einer Proteinfraktion, die die gefärbten Chloroplastenproteide einschließt, beträchtliche, offenbar an das Eiweiß chemisch gebundene Zuckeranteile (Heber, im Druck), so daß der größte Teil des in den isolierten Chloroplasten gefundenen unlöslichen Zuckers auch in vivo dort lokalisiert sein dürfte. Aus alledem geht hervor, daß die Verunreinigung der Chloroplasten zum mindesten durch Zellwandbestandteile vernachlässigt werden kann.

4. Zucker- und Eiweißbestimmungen

An den isolierten Chloroplasten wurden Zucker- und Eiweißbestimmungen durchgeführt. Zur Zuckerbestimmung fand die Anthronmethode (Morris 1948) Verwendung, und zwar wurden die Chloroplasten vor und nach dem Auswaschen mit heißem Wasser untersucht, um freie und gebundene Zucker zu erfassen. Der Gehalt der Chloroplasten an einzelnen Zuckern wurde quantitativ-chromatographisch bestimmt (Heber 1958a).

Von den Eiweißen interessierten vor allem die löslichen Anteile. Sie wurden aus den Chloroplasten mit Wasser ausgewaschen und nach Abzentrifugieren der Chloroplasten mit Trichloressigsäure gefällt. Die resultierende Trübung ließ sich ausphotometrieren, worauf mittels eines Standards die Eiweißkonzentration errechnet wurde. Der pH-Wert der Chloroplasten blieb während der Frosthärtung konstant, so daß keine Elutionsartefakte infolge des pH-Einflusses auf die Wasserlöslichkeit der Eiweiße zu befürchten waren.

Die ausgewaschenen Chloroplasten erwiesen sich mikroskopisch als intakt, wenn sie auch grob granuläre Struktur angenommen hatten.

Es sei bemerkt, daß für diese Untersuchungen nur bis zu 40 mg Chloroplastensubstanz zur Verfügung standen.

Parallel zu diesen Untersuchungen wurden am gleichen Pflanzenmaterial Zucker-, Zellwandsubstanz- und Frostresistenzbestimmungen durchgeführt (zur Methodik vgl. Heber 1958).

Ergebnisse und deren Diskussion

Im Verlaufe unserer bisherigen Untersuchungen wurde festgestellt, daß Zucker ein sehr gutes Frostschutzvermögen für Plasmaeiweiße besitzen. Nun wird aber eine sehr wesentliche Rolle der Zucker gerade neuerdings von verschiedener Seite (u. a. Pisek 1950, Siminovitch und Briggs 1954) bestritten, da bei sehr frostresistenten Pflanzen ein relativ niedriger Zuckerspiegel beobachtet wurde, während andere Arten mit hohem Zuckerspiegel eine niedrigere Resistenz aufweisen. Auch stimmt, wie schon mehrfach erwähnt und auch in den eigenen Untersuchungen bestätigt wurde, der Zuckerspiegel keineswegs immer mit dem Resistenzverlauf überein. Wenigstens teilweise läßt sich das letztere Phänomen dadurch erklären, daß nicht alle Zucker gleich stark gegen die Frostdenaturierung des empfindlichen Proteins wirken und auch bei hohem Zuckergehalt je nach der Zusammensetzung der Zucker eine geringere Wirksamkeit resultieren kann als bei niedrigerem Spiegel mit höherem Gehalt an Monosacchariden (Heber 1958). Diese Erklärung vermag aber vor allen Dingen nicht voll zu befriedigen, wenn die Unterschiede im Zuckergehalt beim Vergleich mit der Frostresistenz zu evident werden und wenn die osmotischen Werte einer Art bei gleichzeitigen Schwankungen der Frostresistenz konstant bleiben, wie das bei mediterranen Immergrünen der Fall ist (Larcher 1954). Außerdem verlangt diese Erklärung eine Voraussetzung, die durchaus nicht erfüllt sein muß. Sie fordert nämlich — und dies gilt überhaupt für eine Übertragung der oben am Modell erarbeiteten Vorstellung einer Frostschutzwirkung der Zucker auf die Zelle —, daß die Zucker auf eine direkte Art und Weise wirken können, also im Plasma lokalisiert sein müssen.

Bei den bisherigen Untersuchungen wird aber teils stillschweigend davon ausgegangen, teils erwähnt, daß die Zucker als Inhaltsstoffe des Zellsaftes zu betrachten sind. Levitt (1956) sagt auf Seite 11, daß dem Zucker eine direkte Wirkung auf Eiweiße abzusprechen sei, da er in der Vakuole lokalisiert wäre.

Um überhaupt eine Übertragung der in vitro gewonnenen Erkenntnisse über die Zuckerschutzwirkung auf die Zelle vornehmen zu können, war es also notwendig nachzuprüfen, ob Zucker zu einem wesentlichen Betrage im Plasma lokalisiert sind. Weiter war dann tunlichst zu untersuchen, ob und inwieweit eine unterschiedliche Verteilung der Zucker innerhalb der Zelle möglich und gegeben ist. Auch bei niedrigem Zuckerspiegel kann ja, eine elektive Verteilung der Zucker vorausgesetzt, ein guter Schutzeffekt resultieren.

Die experimentellen Möglichkeiten zur Untersuchung sind sehr beschränkt. Es bestehen drei denkbare Wege, um zu einer Klärung der aufgeworfenen Fragen zu gelangen.

Zum ersten kann es möglich sein, auf histochemischem Wege in situ Aus-

sagen wenigstens qualitativer oder halbquantitativer Art über eine Verteilung von Stoffen zu machen. Das ist aber schon bei hochmolekularen Stoffen schwierig und erscheint bei den niedermolekularen Zuckern unmöglich, da Diffusionsartefakte gar nicht auszuschließen sind, außerdem eine Reaktion nicht zur Verfügung steht, die die Zucker gleichzeitig sichtbar macht und am jeweiligen Zellort unlöslich festlegt. Dieser Weg scheidet also aus.

Zum zweiten ist denkbar, Plasma und Vakuole zu trennen und gesondert zu untersuchen. Beim kleinzelligen Gewebe höherer Pflanzen ist das aber bis jetzt nicht möglich. Ein gewisser Ausweg besteht insofern, als es gelingt, einzelne Zellorganelle zu isolieren, die mit Sicherheit dem Plasma angehören. An solchen Zellorganellen, von denen wir auf Grund von Eiweißuntersuchungen und manometrischen Messungen annehmen können, daß sie besonders frostempfindlich sind, nämlich an den Chloroplasten, sollten entsprechende Untersuchungen vorgenommen werden, über die gleich noch berichtet wird.

Der dritte Weg ist an sich am einfachsten zu begehen. Er besteht darin, auf indirekte Weise Aufschluß zum einen über eine Lokalisation und zum anderen über eine mengenmäßige Verteilung von niedermolekularen Stoffen zu erhalten. Nach den neueren Erkenntnissen sind ja Tonoplast und Plasmalemma nicht die einzigen semipermeablen Membranen der Pflanzenzelle, sondern ebenso werden Chloroplasten (Granick 1938) und wohl auch Chondriosomen und Mikrosomen (Taft und Levitt 1957, Farrant, Robertson und Wilkins 1953) von einer semipermeablen Hülle begrenzt. Wenn nun im Verlaufe der Frosthärtung im Plasma oder an einzelnen Bereichen des Plasmas niedermolekulare Substanzen — beispielsweise Zucker — angesammelt werden, so ist zu fordern, daß sich das im osmotischen Verhalten ausdrückt: Diese Zellorte müssen an Volumen zunehmen, sofern sie von semipermeablen Membranen umgrenzt sind. Die Volumenzunahme muß sich aber messen lassen. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist es natürlich, daß nicht sicher zu sagen ist, worauf eine gemessene Volumenzunahme tatsächlich zurückgeht, d. h. ob sie eine osmotische Reaktion oder eine echte Vergrößerung des untersuchten Zellbereichs darstellt oder möglicherweise sogar beides.

Wie Assimilationsmessungen ergaben, ist das Assimilationssystem der Zelle, das in den Chloroplasten lokalisiert ist, besonders frostempfindlich. In die gleiche Richtung deutet auch das Verhalten der frostempfindlichen Eiweißfraktion, in der alle grün gefärbten und somit in den Chloroplasten lokalisierten Proteide enthalten sind. Die Chloroplasten müssen also von der Zelle beim Resistenzerwerb besonders geschützt werden, und es war anzunehmen, daß an ihnen eventuell stattfindende Veränderungen besonders leicht festzustellen sind. Aus diesem Anlaß wie auch aus methodischen Gründen wurden vergleichende Größenmessungen an Chloroplasten vorgenommen.

Solche Messungen erscheinen jedoch nur dann sinnvoll, wenn die Bedingungen, unter denen die Pflanzen einer Frosthärtung ausgesetzt werden, möglichst konstant bleiben und so geartet sind, daß eine Zellvermehrung

ausgeschlossen ist, damit nicht etwa sekundäre Vorgänge wie Wachstum o. ä. die Änderungen, die im Verlaufe des Resistenzerwerbes und ursächlich mit diesem verknüpft vor sich gehen, überdecken oder mit ihnen interferieren können. Es wurde deshalb die Frosthärtung in der Kältekammer bei konstanter Temperatur unter neunstündiger Belichtung vorgenommen. Die Größenmessungen an den Chloroplasten erfolgten frühmorgens, damit nicht photosynthetisch gebildeter Zucker, der wieder abtransportiert wird, eine osmotische Größenzunahme vortäuschen konnte.

Abb. 1 zeigt die Ergebnisse der an den Chloroplasten vorgenommenen Messungen, in Okularmikrometereinheiten gegen die Versuchsdauer aufgetragen. Es ist eine deutliche Vergrößerung der Chloroplastendurchmesser im Verlaufe der Frosthärtung festzustellen. Mit der Übertragung der Pflanzen in höhere Temperaturen und der dabei einsetzenden Enthärtung nimmt der Chloroplastendurchmesser wieder ab. Um diese überraschend ausgeprägten Befunde an Hand von Kontrollversuchen nachzuprüfen, wurde die Sorte Criewener in gleicher Weise zu

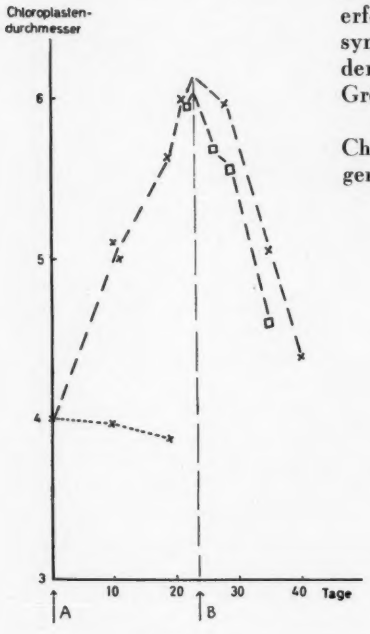


Abb. 1.

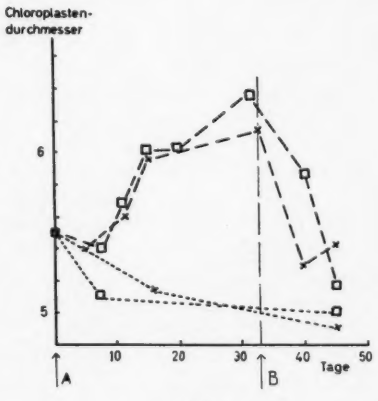


Abb. 2.

Abb. 1. Der durchschnittliche größte Durchmesser der Chloroplasten bei der Frosthärtung und -enthärtung. Kältekammerversuch 1957.

Ordinate: Chloroplastendurchmesser in Okularmikrometereinheiten. Abszisse: Versuchszeit in Tagen. — — — Härtungsversuch, ... Kontrollversuch, x Criewener 192, ⁻ Hauters II, A Härtungsbeginn, B Enthärtungsbeginn.

Abb. 2. Der durchschnittliche Durchmesser der Chloroplasten bei der Frosthärtung und -enthärtung. Kältekammerversuch 1958.

Zeichen wie in Abb. 1.

einem späteren Zeitpunkt in der Kältekammer gehärtet. Im Verlaufe der Frosthärtung ließ sich wieder eine eindeutige Größenzunahme der Chloroplasten in der gleichen Größenordnung wie beim ersten Versuch beobachten. In einem dritten Versuch fand keine derart starke Größenzunahme statt, doch nimmt auch hier der Chloroplastendurchmesser mit Erhöhung der Frostresistenz zu und bei der Enthärtung wieder ab (Abb. 2).

Tab. 1 gibt zu den einzelnen in Abb. 1 angeführten Meßwerten unter Berücksichtigung der ebenfalls ausgemessenen kleinen Achsen der Chloroplasten Volumenberechnungen wieder, wobei das Chloroplastenvolumen zu Versuchsbeginn, d. h. im frostempfindlichen Zustand, gleich Eins gesetzt

Tab. 1. *Die Volumenzunahme von Chloroplasten während der Frosthärtung.*

Härtungsversuch (Temperatur + 2 bis −2° C)		Kontrollversuch (Temperatur ca. 14° C)	
Härtungsdauer in Tagen	Chloroplasten in rel. Volumeneinheiten	Dauer in Tagen	Chloroplasten in rel. Volumeneinheiten
0	1,0	0	1,0
10	1,8	14	1,0
19	2,2	24	1,0
21	2,9	33	0,7
Enthärtungsdauer in Tg. (Temp. 14° C)			
5	2,6		
12	1,6		
17	1,2		

wurde. Im Zustand der größten Frostresistenz haben die frostharten Chloroplasten ein etwa dreifaches Volumen gegenüber dem ungehärteten Zustand.

Worauf sind nun diese Größenzunahmen der Chloroplasten bei Erhöhung der Frostresistenz zurückzuführen? Abb. 3 zeigt nebeneinander die Erhöhung des Zuckerspiegels der Zelle, der Frostresistenz und des Chloroplastendurchmessers im gleichen Versuchsansatz. Beim Vergleich ergibt sich, daß die Größenzunahme der Chloroplasten sowohl mit der Erhöhung des Zuckergehaltes als auch mit der Erhöhung der Frostresistenz parallel geht. Aus dem Gleichgewichtsverhalten von Vakuole und Plasma wird klar, daß bei einer g l e i c h s i n n i g e n Zuckerzunahme in b e i d e n Teilen der Zelle keine oder nur eine unwesentliche Größenzunahme der Chloroplasten resultieren kann: Das Wasserbindungsvermögen der Zelle insgesamt steigt zwar, doch dürfte das kaum zu einer wesentlichen Größenzunahme der einzelnen morphologischen Bestandteile der Zelle führen, da dem ja der Wanddruck entgegenwirkt. Geht aber die Zuckerzunahme von Plasma und Vakuole nicht gleichsinnig vor sich, sondern speichert das Plasma Zucker, so wird es mit seinen Bestandteilen — im speziellen Falle den Chloroplasten — aus osmotischen Gründen auf Kosten der Vakuole „wachsen". Die beobachtete Größenzunahme der Chloroplasten kann natürlich auch auf eine Speicherung von Stoffen n u r in den Chloroplasten zurückgehen. Aus der

Größenzunahme dieser Organelle läßt sich also nicht eindeutig entscheiden, ob eine Speicherung von Stoffen in den Chloroplasten oder im gesamten Plasma vor sich geht. Unsere Beobachtung, daß die Kerne von Weizenzellen eine wesentliche Größenzunahme beim Erwerb der Frostresistenz im Gegensatz zu einem Befund von Kessler und Ruhland (1938) bei Zellkernen von *Sempervivum* vermissen lassen, weist jedoch darauf hin, daß wir einen Vorgang vor uns haben, der sich nur auf einzelne, eventuell besonders frostempfindliche Zellorganelle beschränkt, sich also nicht auf das ganze Plasma erstreckt. Sonst müßte ja eine Größenzunahme von Kernen und Chloroplasten in der gleichen Größenordnung liegen.

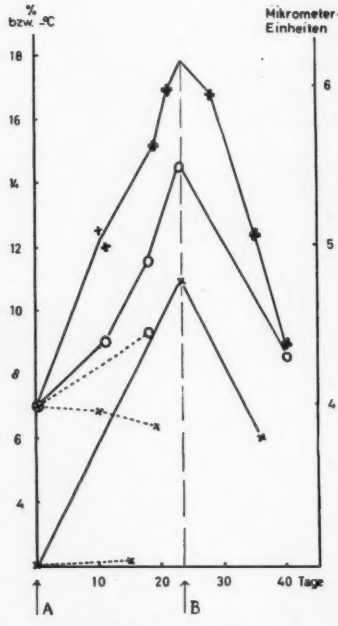


Abb. 3. Vergleich zwischen dem Durchmesser der Chloroplasten und dem Zuckergehalt sowie der Frostresistenz der Blätter im Kältekammerversuch 1957 bei der Sorte Criewener 192. Linke Ordinate: Frostresistenz in °C (diejenige Temperatur, bei der 50% der Blätter überlebten), Zuckergehalt in % des Blatttrockengewichtes; rechte Ordinate: Chloroplastendurchmesser in Okularmikrometereinheiten. Abszisse: Versuchszeit in Tagen + Chloroplastendurchmesser, o Frostresistenz, x Zuckergehalt, ——— Härtungsversuch, ... Kontrollversuch, A Härtungsbeginn, B Enthärtungsbeginn.

Aus allen diesen Daten wäre es möglich zu folgern, daß die beobachtete Chloroplastenvergrößerung auf einer Zuckeraufnahme beruht.

Dieser Schluß ist jedoch nicht zwingend, da neben einer osmotischen Chloroplastenvergrößerung auch eine Größenzunahme durch Aufnahme oder Bildung quellfähiger hochmolekularer Substanzen — eventuell von Eiweißen — möglich ist. Zur Klärung der Frage, ob nur Zucker oder auch Eiweiße die Größenzunahme der Chloroplasten verursachen, ist die chemische Analyse heranzuziehen. Damit kommen wir zu Punkt 2 der eingangs skizzierten Möglichkeiten, über die Lokalisation oder gar Speicherung von Stoffen innerhalb der Zelle zu entscheiden. Es ist nämlich zu versuchen, die fraglichen Zellorganelle im gleichen Zustand wie in vivo zu isolieren und für sich zu untersuchen.

Anfänglich isolierten wir Chloroplasten aus 0,5 m wäßriger Mannitlösung und untersuchten ihren Zuckergehalt. Dabei stellte sich ganz überraschenderweise und im Gegensatz zu unseren Annahmen heraus, daß die Chloroplasten frostempfindlicher Pflanzen mehr Zucker enthielten als diejenigen resistenter Pflanzen. Schließlich fanden wir, daß dieser Zucker gar nicht frei in den isolierten Chloroplasten vorlag, sondern an Eiweiße gebunden war. Ent-

weder enthielten also die Chloroplasten gar keinen Zucker oder es war bei der Isolierungsoperation eine Schädigung dieser Zellorganelle eingetreten, in deren Verlauf vorhandener freier Zucker ausgewaschen wurde.

In einem zuerst von Behrens (1938) angegebenen Verfahren zur Abtrennung von Zellbestandteilen aus organischen Lösungsmitteln fanden wir dann eine brauchbare Methode, den Lebendzustand zu fixieren und anschließend Chloroplasten zu isolieren und zu untersuchen. Im apolaren organischen Lösungsmittel sind weder Zucker noch Eiweiße als ausgeprägt polar gebaute Substanzen löslich, so daß Verlagerungsartefakte nicht zu befürchten sind. Das Pflanzenmaterial wird innerhalb weniger Sekunden auf — 70° C eingefroren, gefriergetrocknet — wobei ebenfalls Lageveränderun-

Tab. 2. *Der Gehalt von Chloroplasten an wasserlöslichen Eiweißen und Zuckern im Vergleich zum durchschnittlichen Zuckergehalt der Zelle und zu ihrer Frostresistenz.*

Material	ungehärtet	gehärtet	gehärtet
Frostresistenz (50%-Totpunkt)	— 7° C	— 10° C	— 14° C
Zuckerspiegel der Zelle (Zucker in % des trockenen Zellinhaltes)	4	8,8	24,9
freie Zucker der Chloroplasten (in % d. trockenen Chloropl.-Subst.)	1	9,0	16,2
wasserlösl. Eiweiße d. Chloroplasten (in % d. trockenen Chloropl.-Subst.)	7	22	39

gen niedermolekularer Körper nicht eintreten können — und in Petroläther/Tetrachlorkohlenstoff zerschlagen. Es war zu befürchten, daß das apolare lipophile Lösungsmittel Lipoide, die einen wesentlichen Bestandteil der Chloroplasten bilden, extrahieren würde und so das Bezugsgewicht, die Chloroplastensubstanz, verfälscht. Es zeigte sich jedoch, daß nicht einmal Xanthophylle zu einem sehr wesentlichen Betrage extrahiert wurden. Das Chlorophyll blieb nahezu vollständig in den Chloroplasten gebunden und damit wahrscheinlich überhaupt alle an Eiweiße festgelegten Lipoide. Aus dem Homogenisat wurde durch Zentrifugieren bei verschiedener Dichte des organischen Lösungsmittels Chloroplastenmaterial isoliert.

In einer bereits veröffentlichten Arbeit (Heber 1957) konnten wir bei der Analyse von Weizenpflanzen, die unter Feldbedingungen gewachsen waren, zeigen, daß niedermolekulare Zucker einesteils in beträchtlicher Konzentration in den Chloroplasten vorliegen, anderenteils dort sogar gespeichert werden können. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse von Chloroplastenuntersuchungen während einer Frosthärtung in der Kältekammer dargestellt. Aus einem Vergleich ergibt sich, daß der Anstieg der frei in den Chloroplasten vorliegenden Zucker (Bezugnahme auf die Chloroplastentrockensubstanz) dem des Gesamtzuckers der Zelle (Bezugnahme auf die Zelltrockensubstanz abzüglich der Zellwandsubstanz, also auf den gesamten Zellinhalt!) bei der Härtung ungefähr parallel läuft. Deutlicher ist das

noch aus Versuchen zu ersehen, die in Abb. 4 dargestellt sind. Es ist hier aber zu berücksichtigen, daß gar nicht ohne weiteres vergleichbare Bezugsgrößen als Maßstab dienten! Die Chloroplasten enthalten ja ganz bedeutend mehr Feststoffe als der Durchschnitt des Zellinhaltes, was bei mikroskopischer Betrachtung schon ohne weiteres aus dem von den übrigen Zellinhaltsbestandteilen stark abweichenden Brechungsindex der Chloroplasten hervorgeht. So gibt Rabinowitch (1945) — wahrscheinlich zu hoch! — einen Feststoffgehalt der Chloroplasten von etwa 50% an, während wir einen durchschnittlichen Feststoffgehalt des Zellinhaltes von ungefähr 10 bis 20% annehmen können. Wenn die Chloroplasten aber beispielsweise einen

Tab. 3. *Der prozentuale Anteil der einzelnen Zucker am freien Zuckergehalt der Chloroplasten während der Frosthärtung in der Kältekammer im Vergleich zu den Chloroplasten-Zuckerwerten der Tab. 2.*

Material: Criewener 192	ungehärtet	gehärtet	gehärtet
Resistenz	— 7° C	— 10° C	— 14° C
freie Zucker in % des freien Zuckergehaltes			
Fruktose	17	7	7
Glukose	20	7	17
Saccharose	33	36	43
Raffinose	20	41	20
Trisaccharid [1]	—	—	6
Tetrasaccharid [1]	10	7	3
Pentasaccharid [1]	—	2	3

[1] Vgl. Heber 1958.

doppelt so hohen Feststoffgehalt besitzen wie der Durchschnitt der Zelle und wenn weiter bei Bezugnahme auf die beiden besprochenen Bezugsgrößen ein paralleler Zuckeranstieg mit jeweils gleichen Werten für Chloroplasten und Zelldurchschnitt bei der Frosthärtung zu beobachten ist, ergibt sich daraus bei Bezugnahme auf eine vergleichbare Größe — etwa das Frischgewicht der Zelle und der Chloroplasten — ein doppelt so hoher Zuckergehalt in den Chloroplasten wie im Zelldurchschnitt. Das bedeutet, daß eine Speicherung von Zuckern in den Chloroplasten stattgefunden hat.

Den Anteil der einzelnen Zucker am freien Zuckergehalt der Chloroplasten gibt Tabelle 3 im gleichen Versuchsansatz wieder, der in Tabelle 2 erörtert wurde. Eine besondere auffällige Veränderung der Zusammensetzung im Verlaufe der Zuckerakkumulation ist nicht zu bemerken.

Also hat sich bei der analytischen Untersuchung gezeigt, daß die beobachtete Größenzunahme der Chloroplasten wenigstens zum Teil auf osmotische Ursachen zurückgehen kann. Bei diesen Ergebnissen ist allerdings zu bemerken, daß die Höhe der Zuckerspeicherung, wie wir sie früher bei Feldmaterial, das unter natürlichen Bedingungen gewachsen war, ge-

funden haben (H e b e r 1957), im Kältekammerversuch nicht erreicht wird. Trotz dieser Befunde bleibt aber die Frage bestehen, ob nicht auch eine Anhäufung von quellfähigen hochmolekularen Stoffen an der Größenzunahme der Chloroplasten bei der Frosthärtung beteiligt ist. Tatsächlich ist nun eine starke Zunahme der wasserlöslichen Eiweiße in den Chloroplasten während der Frosthärtung und eine Abnahme bei der Enthärtung zu verzeichnen, wie aus Tab. 1 und Abb. 5 hervorgeht. Offenbar ist

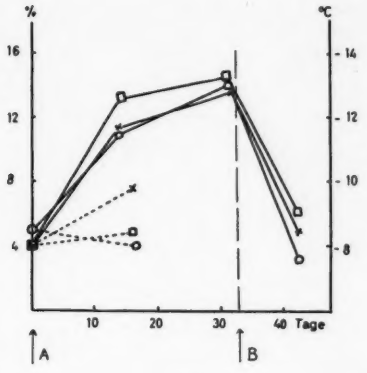


Abb. 4.

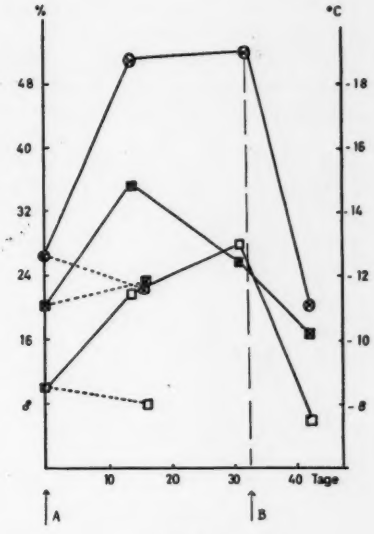


Abb. 5.

Abb. 4. Zuckergehalt der Chloroplasten im Vergleich zum durchschnittlichen Zuckergehalt der Zelle und zur Frostresistenz im Kältekammerversuch 1958.
Linke Ordinate: Zuckergehalt in % (verschiedene Bezugsgrößen!); rechte Ordinate: Frostresistenz in °C (diejenige Temparatur, bei der 50% der Blätter überlebten). o Frostresistenz, □ durchschnittlicher Zuckergehalt der Zelle, bezogen auf den Zellinhalt (= Trockensubstanz minus Zellwandsubstanz), x Gehalt der Chloroplasten an löslichen Zuckern (bezogen auf die trockene Chloroplastensubstanz), ——— Härtungsversuch, ... Kontrollversuch, A Härtungsbeginn, B Enthärtungsbeginn.

Abb. 5. Der Gehalt der Chloroplasten an wasserlöslichen Eiweißen im Vergleich zur Frostresistenz der Blätter. Kältekammerversuch 1958.
Linke Ordinate: wasserlösliche Eiweiße der Chloroplasten in % der Chloroplastentrockensubstanz; rechte Ordinate: Frostresistenz in °C (50%-Totpunkt der Blätter). Abszisse: Versuchszeit in Tagen. ⊗ wasserlösliche Eiweiße des Chloroplasten von Criewener 192, ⊠ wasserlösliche Eiweiße des Chloroplasten von Hauters II, □ Frostresistenz; ——— Härtungsversuch, ... Kontrollversuch, A Härtungsbeginn, B Enthärtungsbeginn.

also die beobachtete Größenzunahme der Chloroplasten bei der Frosthärtung nicht n u r auf einen osmotischen Effekt, der durch elektive Anhäufung von Zuckern zustandekommt, sondern auch auf eine Zunahme von hochmolekularen, nur schwach osmotisch wirkenden Eiweißen zurückzuführen.

Es ist nun zu fragen, ob sich die beobachteten Speichereffekte nur auf Chloroplasten beschränken: Wir können es als sicher betrachten, daß die Chloroplasten ganz besonders empfindliche Teile der Zelle sind, doch schließt das natürlich nicht aus, daß andere Teile der Zelle ebenfalls eine Rolle als Angriffspunkte der Frostwirkung spielen. Daß die Zellkerne von Weizenblättern keine sehr wesentlichen Größenveränderungen während der Frosthärtung aufweisen, wurde bereits gesagt. Noch nicht abgeschlossene Untersuchungen an einer Chondriosomenfraktion berechtigen uns zu der Annahme, daß auch Chondriosomen wie Chloroplasten zur Anhäufung von Zuckern und löslichen Eiweißen während der Frosthärtung befähigt sind.

Tab. 4. *Der Gehalt von Chloroplasten an wasserlöslichen Eiweißen und Zuckern im Vergleich zum durchschnittlichen Zuckergehalt der Zelle und zu ihrer Frostresistenz.* Feldversuch 1957.

Frostresistenz (50%-Totpunkt)	— 11° C	— 10° C	— 10° C
Zuckerspiegel der Zelle (Zucker in % des trockenen Zellinhaltes)	8,7	12,8	39,2
freie Zucker der Chloroplasten (in % des trockenen Chloropl.-Subst.)	20,0	18,8	15,5
wasserlösl. Eiweiße der Chloroplasten (in % des trockenen Chloropl.-Subst.)	40,0	29,7	19,6

Aus allen diesen Ergebnissen scheint hervorzugehen, daß die Resistenzsteigerung durch eine Zunahme von löslichen Eiweißen und Zuckern an Plasmaorten bewirkt wird, die der Frostwirkung ausgesetzt sind, ohne Rücksicht darauf, wie sich der Gehalt an diesen Stoffen in der Vakuole ändert. Einige Ergebnisse mahnen aber zur Vorsicht. In Tabelle 4 sind Analysenwerte von Chloroplasten eines Feldversuches dargestellt. Es sei noch einmal darauf hingewiesen, daß im warmen Gewächshaus angezogene und in der Kältekammer gehärtete Pflanzen in ihrem Verhalten nicht unwesentlich von Pflanzen abweichen können, die auf dem Felde natürlichen Härtungsbedingungen ausgesetzt waren.

In Tabelle 4 wird gezeigt, daß sich die Frostresistenz nicht wesentlich ändert, obwohl der Gehalt an Zuckern und Eiweißen in den Chloroplasten absinkt. Nun stellt eine Resistenz von — 10° C eine recht geringe Frostresistenz dar; denn frostempfindliche Weizenpflanzen vertragen unter den Bedingungen des Resistenztestes ohne weiteres noch Temperaturen von — 6° C bis — 7° C. Es ist möglich, daß es nicht nur auf eine unterschiedliche Verteilung von Frostschutzstoffen zwischen Plasma und Vakuole, sondern in Anbetracht des submikroskopischen Feinbaues beispielsweise der Chloroplasten auch auf eine unterschiedliche Verteilung i n n e r h a l b empfindlicher Plasmaorte ankommt. Schließlich ist denkbar, die beobachtete Unstimmigkeit auch so zu erklären, daß die Chloroplasten im Feldversuch bei hohem Protein- und Zuckergehalt zwar noch frostresistent waren, aber andere Plasmaorte bereits ihre Resistenz verloren hatten. Die empfindlichste Stelle der Zelle muß natürlich deren gesamte Frostresistenz begrenzen.

Zur Klärung aller dieser Fragen müssen noch weitere Untersuchungen vorgenommen werden, doch läßt sich bereits sagen, daß offenbar der Verteilung der schutzwirksamen Stoffe eine zentrale Bedeutung bei der Ausbildung der Frostresistenz zukommt.

Zusammenfassung

Chloroplasten von Weizenblättern weisen Größenschwankungen auf, die dem Gang der Frostresistenz der Pflanze folgen. Die beobachteten Größenveränderungen im Verlaufe von Resistenzerwerb und -verlust sind auf Akkumulation und Abgabe von niedermolekularen Zuckern und wasserlöslichen Eiweißen zurückzuführen. Es wird die Bedeutung dieser Anhäufung von Stoffen in den Chloroplasten für die Frostresistenz erörtert, von denen wenigstens die Zucker in vitro befähigt sind, empfindliche Plasmaeiweiße gegen die Wirkung des Frostes zu schützen.

Herrn Prof. Dr. H. Ullrich sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft gebührt Dank für die Unterstützung und Förderung der Untersuchungen. Herrn Prof. Dr. F. Weiling danke ich für wertvolle Ratschläge betreffs der statistischen Behandlung der Versuchsergebnisse, Frl. v. Fricken und Frau Faust für ihre zuverlässige Mitarbeit.

Literatur

Akerman, A., 1927: Studien über den Kältetod und die Kälteresistenz der Pflanzen. Lund.

Andersson, G., 1944: Gas change and frost hardening studies in winter cereals. Lund.

Behrens, M., 1938: Zell- und Gewebetrennung. Handb. biol. Arbeits-Meth. von Abderhalden, 1363—1392.

Butler, G. W., 1933: Ion uptake by young wheat plants I. Time course of the absorption of potassium and chloride ions. Physiol. Plantarum *6*, 594—616.

Farrant, J. L., R. N. Robertson, and M. J. Wilkins, 1953: The mitochondrial membrane. Nature *171*, 401—402.

Granick, S., 1938: Quantitative isolation of chloroplasts from higher plants. Amer. J. Bot. *25*, 558—567.

Heber, U., 1957: Zur Frage der Lokalisation von löslichen Zuckern in der Pflanzenzelle. Ber. dtsch. bot. Ges. *70*, 371—382.

— 1958: Ursachen der Frostresistenz bei Winterweizen. I. Die Bedeutung der Zucker für die Frostresistenz. Planta *52*, 344—372.

— 1958a: Über eine neue Methode zur quantitativen Stoffbestimmung direkt am Papierchromatogramm, insbesondere zur Analyse von Aminosäure- und Zuckergemischen. Z. analyt. Chem. *161*, 409—421.

Kessler, W., 1935: Über die inneren Ursachen der Kälteresistenz der Pflanzen. Planta *24*, 312—352.

— und W. Ruhland, 1938: Weitere Untersuchungen über die inneren Ursachen der Kälteresistenz. Planta *28*, 159—204.

Larcher, W., 1954: Die Kälteresistenz mediterraner Immergrüner und ihre Beeinflußbarkeit. Planta *44*, 607—635.

Leuthart, F., und A. F. Müller, 1948: Mitochondrien und Citrullinsynthese in der Leber. Exper. *4*, 478—480.

Levitt, J., 1956: The Hardiness of Plants. New York 1956.
— and D. Siminovitch, 1940: The relation between frostresistance and the physical state of protoplasm. Canad. J. Res. C *18*, 550—561.
Morris, D. L., 1948: Quantitative determination of carbohydrates with Dreywoods antrone reagent. Science *107*, 254.
Müller-Thurgau, H., 1882: Über Zuckeranhäufung in Pflanzenteilen infolge niederer Temperatur. Landw. Jahrb. *11*, 751—828.
Pisek, A., 1950: Frosthärte und Zusammensetzung des Zellsaftes bei *Rhododendron ferrugineum*, *Pinus cembra* und *Picea excelsa*. Protoplasma *39*, 129—146.
— 1953: Wie schützen sich die Alpenpflanzen gegen Frost? Umschau *21*, 641.
Rabinowitch, E. L., 1945: Photosynthesis I, 382. New York.
Scarth, G. W., and J. Levitt, 1937: The frost hardening mechanism of plant cells. Plant Physiol. *12*, 51—78.
Siminovitch, D., and D. R. Briggs, 1954: Studies on the chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to its frost hardiness VII. A possible direct effect of starch on the susceptibility of plants to freezing injury. Plant Physiol. *29*, 331—337.
Taft, D. L., and J. Levitt, 1957: Investigations on the cytoplasmic particulates and proteins of potatoe tubers. V. Osmotic behavior of mitochondria. Physiol. Plantarum *10*, 76—78.
Ullrich, H., 1924: Die Rolle der Chloroplasten bei der Eiweißbildung in den grünen Pflanzen. Z. Bot. *16*, 513—562.
— und U. Heber, 1958: Über das Denaturieren pflanzlicher Eiweiße durch Ausfrieren und seine Verhinderung. Planta *51*, 399—413.

Anschrift des Verfassers: Dr. U. Heber, Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn, Meckenheimer Allee 176.

Lipoidal Crystals in Onion

By

Clarence Sterling

Department of Food Technology, University of California, Davis, California

With 12 Figures

(Received October 14, 1958)

For over a century, much attention has been given the extended systems of "laticiferous tubes" which occur in many groups of the flowering plants. Despite this lively interest, the curious laticiferous cells to be found in *Allium cepa* and its close relatives are relatively unknown. These cells were originally described by Hanstein (1860, 1864) and were briefly treated by de Bary (1884). (The writer has not seen the dissertation by Johow, as cited by Sperlich 1939, on their nuclear morphology.) Although Rendle's (1889) investigation was more comprehensive than the earlier ones, little else has been published since his work.

In the course of a study of the laticiferous cells of the bulb scales of *Allium cepa* (var. "Yellow Globe"), the writer has found varying concentrations of unique crystalline bodies. The laticiferous cells of occasional bulbs may all contain such crystals, but usually the crystals are localized in some of the tube-like series of cells and not in others. In about 30% of the bulbs examined, the crystals were completely lacking. None were found in the variety "Calred" nor in an all white (unidentified) variety. The bulbs were obtained from commercial sources during June, July, and August, thus about 4–6 months after harvest.

Crystals are most numerous in laticiferous cells which appear to be senescent (Figs. 2, 3). In these, the latex particles are much sparser than normally; some occasionally are aggregated into quite large droplets (Fig. 1), which assume a Sudan IV stain and are soluble in absolute ethanol. In several cases, the crystalliferous cells were partially collapsed, with a diameter half that of other cells. A few cells were marked by the occurrence of large bubbles of air in the lumen. Although plasmoptysis is characteristic of normal laticiferous cells, it is less frequent in the crystal-bearing ones. However, it must be noted that occasional crystal-bearing cells did not differ microscopically from the normal laticiferous cells.

Fig. 1. Laticiferous cell of onion (fresh section), showing individual droplets (*D*) and coalesced mass of droplets (*C*) along the cell wall. 440 : 1.

Fig. 2. Laticiferous cell of onion (fresh section) with group of elongated crystals. Note spindle-like shape of tabular crystal (*T*). An acicular crystal is at (*A*) 440 : 1.

Fig. 3. Fresh section showing detail of crystal ends of slightly tabular crystal (*T*) and acicular crystal (*A*). 440 : 1.

Fig. 4. Well-developed parallel crystal aggregate in fresh section. This crystal aggregate had floated out of a cut laticiferous cell. 440 : 1.

Fig. 5. Detail of tabular crystal twins (*T*) showing development of the geniculated twins from a common nucleus. These crystals are not in the original laticiferous cell. 440 : 1.

Fig. 6. Mass of crystals in fresh laticiferous cell of onion. Note irregular orientation of crystals here and in Figure 1. 440 : 1.

Physical characteristics of the crystals

Most commonly, the crystals are straight and needle-like (Figs. 2, 3, 6), with either blunt or acute tips. They can attain a length as great as 494 μ but are usually shorter, about 100 to 200 μ long. This type of crystal is quite narrow, with an average diameter of 1–4 μ. Rarely, acicular crystals were found, which were curved into near-semicircular shapes. A second crystal form is more tabular (Figs. 2, 4, 5). The crystal in Figure 5 is an exceptionally well-developed example—178 μ long and 21 μ wide. Most tabular crystals are only 1–4 μ thick, so that as these are turned over, they appear as very thin, crystalline flakes. Angular faces at one end of such a crystal are typical. Occasional tabular crystals approach a spindle—or lenticular shape (Fig. 2) and some are wedge-shaped.

A few crystal aggregates have been found, both among the acicular and tabular crystals. Most often geniculated twins occur, in which a pair of crystals develope at an acute angle from a common nucleus (Fig. 5). In one case a tabular crystal, curved in a gentle S-shape (as seen from the narrow edge), was associated with four needle-like crystals (three at one longitudinal edge and one at the other), which departed at an oblique angle to the flat face of the crystal. A rarer example of parallel growth may be observed in Figure 4.

Needle-like crystals are far more abundant than tabular ones. Over 150 have been counted in a single laticiferous cell (Fig. 6). In contrast, the crystal of Figure 4 was the only one in the cell in which it was found. In another moribund laticiferous cell nearby, three similar tabular crystals seemed to fill the entire cell. Occasional small tabular crystals may be interspersed among acicular ones (Fig. 2).

Although their length constrains them to occupy principally longitudinal positions in the cell, the crystals are never parallel to one another. They occur in heterogeneous arrangement, usually lying close to one of the transverse end walls of the cell. The crystals lie in the cell vacuole and can move with the latex particles. Occasional crystals seem to be attached to the end wall; and not infrequently the appearance is encountered of a crystal which seems to be transfixing that wall, part of the crystal being in the adjacent laticiferous cell of the "tube." For purposes of discussion, below, it should be noted that bodies of unique shape have been found in these laticiferous cells (Figs. 7–10). These are not the nuclei of the cells in question.

Evidences of internal structure are rare. On tabular crystal had clear longitudinal striae; and similar markings are noticeable in the large crystal of Figure 4. The crystals are highly refractive. Under the polarizing microscope, between crossed nicol prisms, all the crystals are birefringent. Although conoscopic observation was difficult, it is believed that the crystals are biaxial: if the acicular crystals are rotated about their longitudinal axis (which is at a position of 45° to the axes of the crossed nicol prisms), the luminosity constantly changes in a discontinuous fashion from intense brightness to virtual darkness and back again. As observed with light perpendicular to their broad face, the tabular crystals are weakly

birefringent. It was not possible to observe the birefringence along the broad face of the tabular crystals. In the acicular crystals, the measured maximum birefringence was — 0.0204.

The sign of birefringence is always negative to the long axis of the crystals. Occasionally, this had to be determined by the method of Laves and Ernst (1943). Form birefringence may be responsible for a part of the total birefringence. However, due to the ready solubility of the crystals in the various fluids used for immersion, this could not be ascertained.

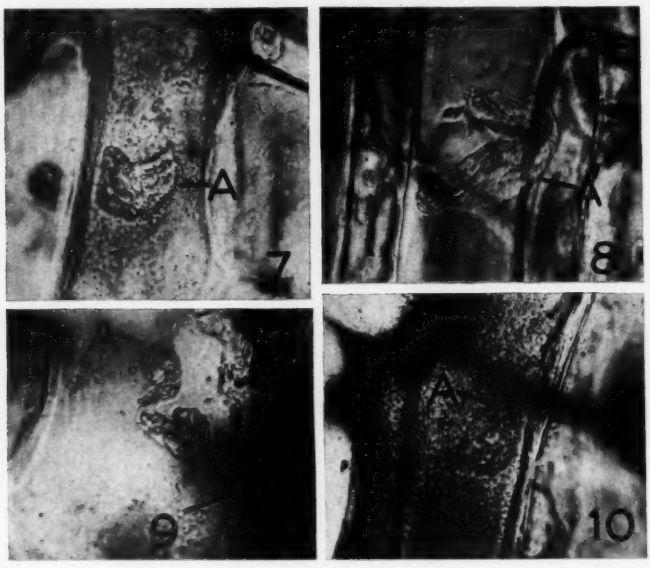


Fig. 7, 8, 9, 10. Amorphous bodies (*A*) floating in vacuole in different laticiferous cells. The cells of Figures 7 and 10 did not have crystals. 440 : 1.

The crystals generally will sink in water. Sometimes they may be embedded in a surface film, but if removed from that film, they tend to sink. Hence, their specific gravity is greater than 1. Under a slight bending stress, the crystals prove to be flexible and completely elastic.

Microchemical characteristics of the crystals

In dilute (5%) mineral acids and dilute (4%) NaOH, no change can be observed in crystal structure or birefringence. In 10% H_2SO_4, some irregularity in outline and some loss of birefringence is apparent after 24 hours. In concentrated HCl or HNO_3, the crystals eventually break down, leaving residues of refractive droplets, which are not birefringent. Concentrated H_2SO_4 brings about the relatively rapid disappearance of cellulose and other cell components before the crystals are noticeably attacked. After only the crystals and the cuticle remain, the crystals are soon broken down

and disappear. (No yellow stain is brought about by the use of concentrated HNO_3.)

In a saturated aqueous solution of NaOH, the crystals remain unchanged for at least as long as 5 days. (They remain unaffected also by a solution of equal parts of saturated NaOH and concentrated NH_4OH.) However, if, after immersion in concentrated NaOH, the crystal-bearing sections are rinsed in water several times, the crystals gradually begin to swell. This event is followed by a longitudinal splitting which does not extend completely to the tips and, within a few hours, by the assumption of va-

Fig. 11.

Fig. 12.

Fig. 11. Myelin-like figures produced during swelling and longitudinal splitting of fresh crystals in a laticiferous cell. This appearance followed several days of immersion in saturated NaOH, succeeded by a brief period of rinsing in distilled water. 440 : 1.

Fig. 12. Local swelling of crystals and formation of droplets after treatment with chloral hydrate in water (5 : 2). 440 : 1.

rious curved and twisted shapes, such as rings and figure 8's (Fig. 11). Throughout both the periods of immersion in NaOH and of changes in shape after rinsing, the sign and the intensity of birefringence remain unaltered.

Although it was first supposed that the crystals could be preserved in ethanol for later study, this belief proved erroneous. The crystals are completely soluble in 80%, 95%, and 100% ethanol, in acetone, and in toluol. They are somewhat less soluble in ether. When toluol or ether are added to fresh sections, the crystals are immediately broken down, twisting and curving, to form non-birefringent, but refractive, droplets. Dried, isolated crystals do not immediately dissolve in standing ether. Even after repreated treatments with ether, a residue of the crystal may remain on the slide.

The crystals are insoluble in glycerol, in 5% aqueous NaCl, and in cold water. They resist solution in warm water but disappear after 5 minutes of boiling. In cold 6 M urea, they are generally insoluble, with perhaps some slight swelling and dissolution of their tips. In a 5 : 2 concentration

in water at room temperature, chloral hydrate brings about local swellings along the crystals (apparently involving droplet formation) and the gradual disappearance of the crystals with the attendant formation of refractive droplets (Fig. 12). These droplets may attain a diameter of 30 μ and are not birefringent.

In 20% formaldehyde and in saturated aqueous picric acid, the crystals eventually disintegrate: very slowly in the former, quite rapidly in the latter. There appears to be a loss of crystal substance in these, and the refractive droplets are much smaller and fewer in number than in other cases of breakdown. The crystals dissolve in saturated alcoholic $HgCl_2$. After standing 24 hours in saturated picric acid or 5 days in 20% formaldehyde or concentrated NaOH, the crystals are still readily soluble in absolute ethanol.

The following aqueous stains were not adsorbed by the crystals: congo red, aniline blue, resorcin blue, acid fuchsin, eosin, or I_2KI. In the cold, Millon's reagent did not produce a noticeable phenolic reaction in the crystals; and on being heated in this reagent, the crystals disappeared. Sudan black, in glycerol, brought about a very slight darkening of the crystals. In a saturated solution of Sudan IV (70% ethanol, 10% glycerol, and 10% water) the crystals assumed a very slight pink color. During 24–48 hours in this medium, the crystals gradually broke down into refractive, non-birefringent droplets, which accumulated Sudan IV to the extent of becoming brightly orange-red. Treatment of normal laticiferous cells with Sudan IV produced an orange-red stain in the latex particles. In senescent cells, the coalesced droplets at the wall were also so stained [1]. Prolonged (5—6 minutes) boiling of sections with Millon's reagent gave a general very light pink color in the section and a slightly deeper pink color in the individual tubes of laticiferous cells.

At a concentration of 0.5%, hog pancreas lipase in neutral solution slowly caused a localized thinning and eventual transverse scission at one or two places along isolated crystals at 28° C. Under the same conditions, a solution of ficin had no effect on the microscopic structure of the crystals.

Discussion

From the standpoint of morphology alone, there is much to recommend the view that the crystals in the laticiferous cells of onion correspond to the crystalloid spindles first described by Molisch (1883) and subsequently found by many other authors (Mikosch 1890, Wakker 1892, Gicklhorn 1913, Meyer 1920, Smith 1930, Soukhov and Vovk 1938, Kassanis and Sheffield 1941, Küster 1948, Weber 1953, etc.). There is a close resemblance in form, in fibrillate structure of the

[1] In onions stored until October, laticiferous cells could be found with large accumulations of grape-like clusters of refractive droplets 2–10 μ in diameter. Latex particles were scarce in these. Application of Sudan IV stain solution caused the droplets to coalesce and eventually to become reddish-orange. In some laticiferous cells, all transitions were found between refractive droplets, coalesced masses, and acicular crystals—the latter being irregular and short.

larger crystals, and even in alcohol solubility (*cf.* Molisch 1885, Mikosch 1890) and solubility in ether (Molisch 1885). Although the evidence for fatty composition is quite strong, there are few reports of native crystalline fat (Molisch 1923, Küster 1956). Moreover, the high specific gravity is anomalous for fatty substances. It is possible that a very well crystallized fat, in the β form, may reach a specific gravity of 1.02–1.04 (Bailey 1950), but this is quite rare. On the other hand, proteinaceous crystals are quite common in the plant kingdom.

Even though a negative birefringence is characteristic of crystalline micelles of native fats, there is a proteinaceous counterpart in the negative intrinsic birefringence of bovine fibrinogen (Hocking, Laskowski, and Scheraga 1952). [However, it is much more characteristic of fibrous proteins to have a positive intrinsic birefringence, such as has been reported for the protein spindles in plants (Küster 1934, 1948; Kassanis and Sheffield 1941).]

It is of interest that protein spindles have been assigned a virus relationship. (Bawden 1950, Weber 1953, Amelunxen 1958, etc.) Such bodies are most numerous in infected plants—often not occurring in healthy ones—and are particularly noteworthy in moribund parts. The parallel with the occurrence of crystals in senescent laticiferous cells of onion is an interesting coincidence. Even the bizarre bodies of figures 7–10 above could be interpreted in terms of the "X-bodies" (Bawden 1950) of virus-infected plants. If the evidence for the proteinaceous nature of these crystals were less tenuous, one might suggest the possible existence of a non-destructive virus organism in the onion. However, such considerations must be purely conjectural. The preponderance of evidence given above favors a lipid composition for these crystals.

That the crystals are lipoidal is suggested by their solubility in common fat solvents, their relative resistance to concentrated sulfuric acid, their high refractivity—and the high refractivity of the droplets derived from them, their negative birefringence, their staining with typical fat stains, the occurrence of myelin-like forms (Molisch 1923, Gicklhorn 1932) following NaOH treatment, and the accessibility to lipase attack. The normal presence of much lipoidal material in onion cells is suggested by the experiments of Gicklhorn (1932).

Elongated crystals of calcium oxalate (Rendle 1889) could not be detected in the laticiferous cells. Rendle (1889) had declared that fatty or proteinaceous materials were absent from these cells. Evidence has been presented here that there are fatty components in these cells and that there are phenol-containing compounds which give the Millon reaction. These latter may or may not be proteinaceous.

Summary

Elongated acicular and tabular crystals have been found in the laticiferous cells of *Allium cepa* (var. "Yellow Globe"). Although these show predominantly lipoidal properties, a possible proteinaceous relationship has been discussed.

References

Amelunxen, F., 1958: Die Virus-Eiweißspindeln der Kakteen. Darstellung, elektronenmikroskopische and biochemische Analyse des Virus. Protoplasma *49*, 140.

Bailey, A. E., 1950: Melting and Solidification of Fats. Interscience Publishers, Inc., New York.

Bary, A. de, 1884: Comparative Anatomy of the Vegetative Organs of the Phanerogams and Ferns. Clarendon Press, Oxford.

Bawden, F. C., 1950: Plant Viruses and Virus Diseases. 3rd Ed. Chronica Botanica Co., Waltham, Massachusetts, U. S. A.

Gicklhorn, J., 1913: Über das Vorkommen spindelförmiger Eiweißkörper bei *Opuntia*. Öst. bot. Z. *63*, 8.

— 1932: Intracelluläre Myelinfiguren und ähnliche Bildungen bei der reversiblen Entmischung des Protoplasmas. Protoplasma *15*, 90.

Hanstein, J., 1860: Ein noch nicht bekanntes System schlauchförmiger Gefäße im Parenchym der Blätter und des Stengels vieler Monocotylen. Mber. K. Preuß. Akad. Wiss. Berlin *1895*, 705.

— 1864: Die Milchsaftgefäße und die verwandten Organe der Rinde. Wiegandt u. Hempel, Berlin.

Hocking, C. S., M. Laskowski, Jr., and H. A. Scheraga, 1952: Size and shape of bovine fibrinogen. J. Amer. Chem. Soc. *74*, 775.

Kassanis, B., and F. M. L. Sheffield, 1941: Variations in the cytoplasmic inclusions induced by three strains of tobacco mosaic virus. Ann. appl. Biol. *28*, 360.

Küster, E., 1934: Anisotrope Fibrillenbündel in Pflanzenzellen. Ber. dtsch. bot. Ges. *52*, 364.

— 1948: Über die Eiweißspindeln von *Impatiens*. Biol. Zbl. *67*, 27.

— 1956: Die Pflanzenzelle. 3. Aufl. G. Fischer Verlag, Jena.

Laves, F., and T. Ernst, 1943: Die Sichtbarmachung des Charakters (+ bzw. —) äußerst schwacher Doppelbrechungseffekte. Naturwiss. *31*, 68.

Meyer, A., 1920: Morphologische und physiologische Analyse der Zelle der Pflanzen und Tiere. G. Fischer Verlag, Jena.

Mikosch, C., 1890: Über ein neues Vorkommen geformten Eiweißes. Ber. dtsch. bot. Ges. *8*, 33.

Molisch, H., 1885: Über merkwürdig geformte Proteinkörper in den Zweigen von *Epiphyllum*. Ber. dtsch. bot. Ges. *3*, 195.

— 1923: Mikrochemie der Pflanze. 3. Aufl. G. Fischer Verlag, Jena.

Rendle A. B., 1889: On the vesicular vessels of the onion. Ann. Bot. *3*, 169.

Smith, J. H., 1930: Intracellular inclusions in mosaic of *Solanum nodiflorum*. Ann. appl. Biol. *17*, 213.

Soukhov, K. S., and A. M. Vovk, 1938: Mosaic of cultivated cereals and how it is communicated in nature. C. r. (Doklady) acad. sci. U. R. S. S. *20*, 745.

Sperlich, A., 1939: Das tropische Parenchym. B: Exkretionsgewebe. Handb. Pflanzenanat. Bd. *IV*, 1. Abt., 2. Teil.

Wakker, J. H., 1892: Ein neuer Inhaltskörper der Pflanzenzelle. Jb. wiss. Bot. *23*, 1.

Weber, F., 1953: Eiweißspindeln (Viruskörper) in vergilbenden *Pereskia*-Blättern. Öst. bot. Z. *100*, 319.

Protoplasmatische und biorheologische Untersuchungen an pflanzlichen Milchsäften

Von

Hans H. Pfeiffer

Aus dem Laboratorium für Polarisations-Mikroskopie, Bremen I.

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. Oktober 1958)

1. Zielsetzung

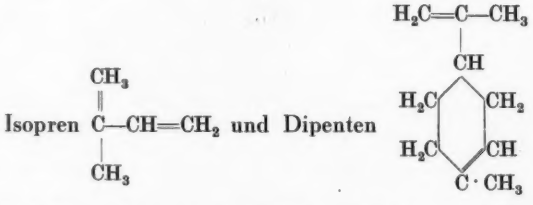
Nach Berthold (1886, S. 30) sind die pflanzlichen Milchsäfte, welche sich bei Euphorbiaceen und Sapotaceen in ungegliederten Milchröhren, bei vielen Apocynaceen, Moraceen, Euphorbiaceen, Compositen und Papaveraceen in gegliederten Milchröhren (sogenannten Milchgefäßen) finden, „nichts weiter als ein eigentümlich metamorphisierter Plasmakörper, in welchem auf dem Höhepunkt seiner Entwicklung ein Saftraum nicht vorhanden ist, der aber gegenüber dem gewöhnlich in den Zellen sich findenden Plasmakörper durch größere Leichtflüssigkeit charakterisirt ist" (Sperrung vom Verf.). Nach älteren Untersuchungen von E. Schmidt und F. Kallen, die auch Berthold (l. c.) zitiert, und namentlich nach Molisch (1901, S. 40), deren Ansicht heute wohl die verbreitete ist (Küster 1956, S. 565), haben wir aber in dem Milchsaft nur einen spezifisch ausgebildeten Zellsaft zu sehen, welcher entsprechend seiner speziellen Funktion im Pflanzenkörper bis zur Unkenntlichkeit abgewandelt worden ist. Für die letztere Interpretation werden auch Befunde bei der Kultur in vitro (W. Bobilioff) herangezogen, und H. Popovici und für Podostemonaceen F. A. F. C. Went haben sich derselben Deutung angeschlossen, wie von Küster (l. c.) angeführt wird. Immerhin scheint es eine dankbare Aufgabe, mit dem Milchsaft, wie er von *Lactuca virosa*, verschiedenen *Taraxacum*-Arten, der kultivierten *Euphorbia resinifera* und einigen wild vorkommenden Euphorbiaceen leicht zu beschaffen ist, einige protoplasmatische und biorheologische Versuche anzustellen, um vielleicht zu einem neuen Argument zur Entscheidung der Frage zu kommen.

2. Histologische Untersuchungen

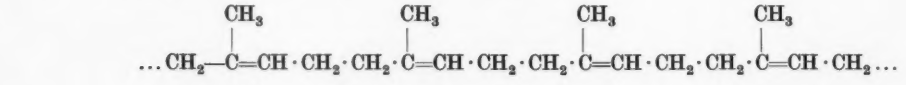
Begonnen wurde mit histologischen Untersuchungen der Pflanzengewebe, wobei auch unausgereifte Fruchtkapseln von *Papaver somniferum* noch hinzugezogen wurden. Dabei zeigte sich, wenn phasenmikroskopisch mit Beugungsplättchen $0{,}2\,A + 0{,}25\,\lambda$ beobachtet wurde, daß die Milchröhren und -gefäße der genannten Objekte durchgängig innerhalb eines überaus dünnen protoplasmatischen Wandbelages eine wäßrige Emulsion (bzw. teilweise Suspension) umschließen, welche nach Angaben der Literatur neben anderen Substanzen häufig verschiedene Alkaloide enthält. Nach mehrwöchigem Einlegen der Pflanzenteile in eine gesättigte wäßrige Lösung von Kupferacetat, Auswaschen des überschüssigen Kupfers und Konservieren in 50% Äthanol lassen sich im Milchsaft leuchtend grün gefärbte Harztropfen nachweisen. Längsschnitte durch die Achsen der genannten Pflanzen und der *Euphorbia splendens* ergeben nach Behandlung mit verdünnter wäßriger Jodlösung und eventuell Nachfärben mit wäßrigen Eosin- oder Erythrosinlösungen eine grünlich-gelb oder rosa nuancierte Färbung von Kautschuktröpfchen und lassen etwa vorkommende Stärkekörner purpurrot erscheinen.

3. Abgezapfter Milchsaft

Beim Abzapfen durch Anschneiden der Milchröhren und -gefäße kann der Milchsaft nicht klar erhalten werden, weil er durch die darin emulgierten (und suspendierten) Tröpfchen unlöslicher Fette, Kautschuk, Guttapercha usw. getrübt wird. Der im Milchsaft gefundene Kautschuk, dessen Tröpfchen im frischen Saft mit Alkanna tiefrot gefärbt werden können, ist nach Harris polymerisiertes Dimethylcyclooctadien, welches bei pyrogener Zersetzung



liefert und nach Staudinger (1932) in seiner Fadenmolekel in sehr langer Kette vielleicht um 1300 Isoprenreste enthält:



Aufgefangener Milchsaft muß sofort mikroskopiert und experimentell untersucht werden, da sonst die Kautschukteilchen schon beim Stehen an der Luft alsbald zu koagulieren beginnen. Gefördert wird dieser Vorgang durch Zugabe geringer Mengen von Essig- oder Milchsäure oder durch Beeinflussung mit Rauch. Mikroskopiert wird der Milchsaft nach Bedecken

mit einem Standard-Deckglas von 0,18 mm Dicke. Mit Beugungsplättchen A^+ erscheinen darin enthaltene Teilchen höherer Lichtbrechung leuchtend hell, mit Plättchen A^- dunkel.

4. Rheologische Milchsaftmessungen

Zur Messung der Viskosität des Milchsaftes diente eine Apparatur, die der Meßvorrichtung nach S. Tsuda angeglichen wurde, welche auch von W. Ostwald zusammen mit H. Malss und mit H. Roederer benutzt wurde (vgl. Philippoff 1942. S. 64). Dabei wird der in eine 0,2-cm^3-Pipette mit 0,001-cm^3-Teilung aufgefangene Milchsaft durch Fremddruck durch eine bis zu 5 cm lange Kapillare in eine andere Pipette hinüberbewegt und das Strömungsvolumen an der Pipettenteilung in Kubikzentimeter abgelesen. Da es sich bei dem Milchsaft wegen der eingeschlossenen Teilchen um eine hoch strukturviskose Substanz handelt, bleibt ein zusätzlicher Strömungswiderstand und damit eine fehlerhafte Erhöhung der ermittelten Viskositätswerte aus. Auch die Mitwirkung von Oberflächenspannung kann seit langem bei der Apparatur ausgeschlossen werden. Die gesuchte Fließkurve wird im doppelt-logarithmischen Koordinatensystem durch Auftragen der Geschwindigkeit D (als Ordinate) in sec^{-1} gegen die Schubspannung τ (als Abszisse) in dyn/cm^2 erhalten (Abb. 1). Aus der Eigenart der Abhängigkeit der Viskosität von der Intensität der Schubspannung folgt die Nicht-Newtonsche Natur des Milchsaftes, d. h. seine Strukturviskosität oder der nichtlineare Verlauf von η bei zunehmenden τ-Werten. Bei hohen Schubspannungen tritt manchmal auch ein Knick der Viskositäts-Geschwindigkeitskurve auf, für den noch keine zureichende Deutung gefunden werden konnte. Wird der Milchsaft vor dem Versuch gerührt, so steigt die Viskosität und sinkt wiederum bei nachfolgendem Verbleiben in Ruhe. Doch resultiert diese Besonderheit wohl nicht wie bei manchen Emulsionen durch angebliche „inverse Thixotropie" (die nach einem Vorschlag des Joint Committee of the International Council of Scientific Unions besser als „shear-rate blockage" zu bezeichnen ist; s. Pfeiffer 1958), sondern ist in unserem Falle weit mehr eine Folge koagulativer Prozesse.

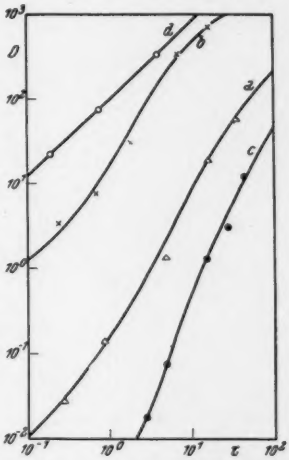


Abb. 1. *a—d* Fließkurven des Milchsaftes von *Lactuca virosa* (*a* nach Zusatz von 0,25% Calciumoxalat, *b* ebenso, doch verdünnt auf 50% mit Aqu. bidest.), *Euphorbia splendens* (*c*) und reinem Wasser (*d*).

5. Einfluß des dispersen Anteils

In der Literatur liegen eine ganze Reihe von Bemühungen vor, bei dem rheologischen Verhalten von Emulsionen die Viskositäten der dispersen

Phase und des Dispersionsmittels zu separieren. Auf pflanzliche Milchsäfte mit emulsoiden Teilchen normaler Größe, welche nicht deformierbar sein mögen, kann etwa eine von G. Broughton und L. Squires vorgelegte Beziehung

$$\log\left(\frac{\eta_{\infty}}{\eta_l}\right) = \alpha + \beta\,\Phi$$

benutzt werden, in welcher Φ das Gesamtvolumen aller Teilchen (deren Durchmesser also nicht in die Gleichung eingeht) und α, β Konstanten darstellen, während η_{∞} aus der Asymptote bei hohen Schergeschwindigkeiten

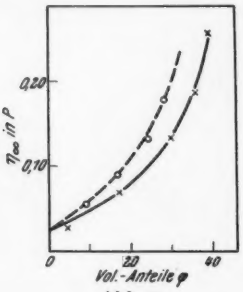


Abb. 2

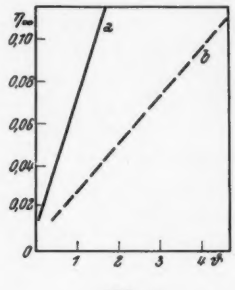


Abb. 3

Abb. 2. Kurven der Konzentrationsabhängigkeit (in Volumanteilen φ) von Viskosität η_{∞} und Fließgrenze ϑ bei wechselnder Azidität (Objekt: *Taraxacum palustris;* x——x pH 8,6; o- - - - o pH 9,1).

Abb. 3. Relation zwischen η_{∞} und Fließfestigkeit ϑ bei Milchsaft von *Taraxacum palustris* und bei (*a*) pH 8,6 bzw. (*b*) pH 9,1.

erhalten wird. Für die in den Milchsäften vorkommenden Hochpolymeren mit langen Ketten werden wir hingegen besser zu einer Gleichung von Staudinger (1932) greifen, welche wir umgeformt schreiben können:

$$\eta_s = \eta_l\,(K_m\,M\,c + 1),$$

wenn M das Molekulargewicht, K_m eine von Art und Struktur der Kettenmolekel abhängige Konstante, c die Konzentration und η_s die Viskosität der Emulsion, η_l die des Lösungsmittels, also Wassers, bedeuten. Bei Substituieren von $K_m = 2{,}5$ und Annahme eines Mol.-Gew. von 90.000 für Kautschuktröpfchen ergeben sich bei einer nach der Literatur wahrscheinlichen Konzentration wohl einleuchtende und mit den empirischen Befunden gut übereinstimmende Werte der Viskosität des Milchsaftes.

6. Weitere rheologische Gesetzmäßigkeiten

Wenn man zur Hemmung der Koagulation geringe Mengen eines Oxalats oder Citrats zusetzt und dann mit Aqu. bidest. in bestimmter Weise verdünnt, bekommt man weitere Fließkurven (Abb. 1), welche sich allmählich der für reines Wasser erhaltenen Gerade annähern. Diese Fließkurven

können nach der Konzentrationsabhängigkeit entweder in bezug auf die Viskosität η oder die Fließgrenze ϑ ausgewertet werden (Abb. 2); beide Werte nehmen mit der Konzentration stark zu. Alkalinisierung der Milchsäfte durch Versetzen mit Veronalacetatpuffer pH 8,6 läßt hinsichtlich der Azidität im alkalischen Bereich die erhebliche Zunahme der Fließgrenze ϑ gegenüber nur geringer Steigerung der Viskosität τ (Abb. 2) erkennen. Wenn aber auch eine mögliche Abhängigkeit des rheologischen Verhaltens vom dispersen Anteil der Milchsäfte nicht immer mit Sicherheit erfaßt werden kann, muß doch angenommen werden, daß die unbestimmte, schwer exakt zu definierende und oft wechselnde Polydispersität und ihre unbekannte Änderung bei den Versuchsmaterialien unter wechselnden Versuchseingriffen eine allgemeine Ermittlung schwierig, wenn nicht unmöglich machen. Eine Viskositätsabnahme mit ansteigender Temperatur scheint für Kolloide normal zu sein (Heilbrunn 1938, S. 43), und das Emulsoid der Milchsäfte macht da keine Ausnahme (Abb. 3).

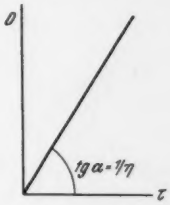


Abb. 4. Fließkurve einer Newtonschen viskosen Flüssigkeit.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend erscheinen die Komponenten der hydratisierten, hochdispersen Emulsoide der pflanzlichen Milchsäfte als Flüssigkeitstropfen mit Solvathülle, welche durch diverse experimentelle Maßnahmen beeinflußt werden können. Vor allem der Einfluß der Temperatur auf η_{rel} und die Abhängigkeit der Viskosität vom Dispersitätsgrade können durch solche Deutung zwanglos erklärt werden. Ihr Nicht-Newtonsches Fließverhalten nähert die Milchsäfte zwar scheinbar dem Protoplasma, zumal die wäßrigen Säfte aus dem mittels Pipette entnommenen Vakuoleninhalt von *Nitella*-Zellen in rheologischen Versuchen Newtonsche Fließkurven ergeben (Abb. 4). Aber dieses Argument darf nun auch nicht zu stark beansprucht werden, da die Umkleidung der Milchsäfte in Milchröhren und -gefäßen durch einen, wenn auch wegen der geringen Dicke schwer nachweisbaren Plasmamantel auch jenen anatomischen Elementen die Zellnatur nicht vorenthalten kann. Dann aber haben wir in den Milchsäften fraglos Zellsäfte zu erblicken, welche an völlig andersartige physiologische Funktionen adaptiert erscheinen. Ordnen wir die pflanzlichen Milchsäfte neben die vakuolären Zellsäfte, so gilt in noch erweitertem Sinne, was Seifriz (1936, S. 27) von den Vakuolen sagt: „The form, structure, contents, mechanism, origin, and function of the vacuoles differ greatly", und (l. c. 28): „The contents of vacuoles vary as much as their shape and size." Eine Leitfunktion haben Milchröhren und -gefäße offenbar nicht, doch scheint nach der Literatur ihr Inhalt den Wundverschluß zu erleichtern und vielleicht auch ein Schutzmittel gegen Tierfraß zu sein. Ob die Milchsäfte wegen ihres Kolloidgehaltes auch den osmotischen Druck regulieren helfen, ob sie bloße Exkrete darstellen oder ob Milchröhren und -gefäße als Nahrungs-

speicher fungieren können, bleibt unsicher, doch ist über solche Fragen an dieser Stelle nicht weiter abzuhandeln.

Summary

As an introduction the two interpretations of the chyle from milk ducts and milk vessels of certain plants are pointed out. Under the phase microscope the chyle appears comparable to the content of vegetal vacuoles, and like this it is surrounded by a very thin mantle of plasm. From rheological experiments with the emulsoid it follows its Non-Newtonian flow behaviour. There are studied several measurements of the dependence of viscosity on the shear modulus τ, the degree of dispersity and dilution, the temperature and the dispersal portion, and the dependence on concentration is to assess for the viscosity η_∞ and for the yield stress ϑ. Despite of the Non-Newtonian flow character of the chyles these are not to co-ordinate to the protoplasm but owing to the histologic finds and because of the behaviour of the vacuolar sap of *Nitella* cells they are compared with the content of vacuoles.

Literatur

Berthold, G., 1886: Studien über Protoplasmamechanik. Leipzig.

Heilbrunn, L. V., 1958: The viscosity of protoplasm. Protoplasmatologia II. C 1. Wien.

Küster, E., 1956: Die Pflanzenzelle, 3. Aufl. (Herausg. v. K. Höfler). Jena. — Hier die weitere Literatur.

Molisch, H., 1901: Studien über den Milchsaft und Schleimsaft der Pflanzen. Jena.

Pfeiffer, H. H., 1958: Rheologica Acta *1*, 102.

Philippoff, W., 1942: Viskosität der Kolloide. Dresden und Leipzig.

Reiner, M., 1958: Rheology. In: S. Flügge, Handb. d. Physik *6*, 434. Berlin-Göttingen-Heidelberg.

Seifriz, W., 1936: Protoplasm. New York and London.

Staudinger, H., 1932: Die hochpolymeren organischen Verbindungen. Berlin.

Le caractère précocement idioblastique des initiales stomatiques du pétiole de *Populus pyramidalis* Rozier

Par

Jean Meyer

Institut de Botanique de l'Université de Strasbourg

Avec 5 Figures

(Reçu le 25 Octobre 1958)

On sait depuis longtemps (Strasburger 1866) que les stomates se forment aux dépens d'initiales spécialisées. Les études dans ce domaine ont repris de l'actualité avec la parution des travaux de Bünning et Sagromsky (1948), Sagromsky (1949), Weber (1949), Bünning et Biegert (1953), Zimmermann, Woernle et Warth (1953) sur les conditions d'apparition des initiales stomatiques et de leur répartition sur l'organe. Ces travaux amènent à la conclusion que la division différencielle inégale aboutit à la formation, à distance du méristème apical, d'une ou de plusieurs cellules rajeunies formant un « méristémoïde » à partir duquel se différencie l'appareil stomatique ou le stomate. Autour de chaque « méristémoïde » il s'établit généralement une zone où toute nouvelle formation de « méristémoïde », c. à. d. d'initiale stomatique nouvelle, est inhibée (« Hemmzone » de Bünning et Sagromsky 1948).

La différenciation du stomate aboutit de toute évidence à la formation de cellules morphologiquement, cytologiquement et physiologiquement très spécialisées. Ces dix dernières années de nombreux travaux sont venus insister sur le caractère hautement spécialisé des stomates. Les uns s'appuient sur la structure submicroscopique de leur membrane (Ziegenspeck 1953), les autres sur les caractères cyto-physiologiques qui distinguent les cellules stomatiques des cellules épidermiques banales. Depuis longtemps déjà, la richesse en chloroplastes susceptibles de forte amylosynthèse en leur sein avait frappé les chercheurs. Plus récemment, une série de caractères négatifs ont fait l'objet de publications mettant l'accent sur la spécialisation cytophysiologique des cellules stomatiques. Au point de vue plastidal, ces observations montrent l'absence dans les stomates des chromoplastes (Schittengruber 1953) et des protéinoplastes (Thaler 1953), alors que ces plastes existent dans les cellules épidermiques banales de la même plante. Au point de vue produits d'élaboration, Weber signale l'incapacité des cellules stomatiques à former des « stérinoplasts » 1953 b),

des « élaïoplastes » (1933 a) et des cristaux d'oxalate de Ca (1933 c) : absence également des cristalloïdes protéiques ou autres inclusions cytoplasmiques voisines (Brat, Kenda et Weber 1931, Thaler 1933, 1936, Weber 1933 d).

L'absence fréquente d'anthocyane dans les cellules stomatiques a été signalée par Kenda (1930) et Brat et Weber (1931). Ces derniers auteurs font remarquer que ce pigment vacuolaire, quand cependant il existe également dans les cellules stomatiques, se distingue de celui des autres cellules par sa couleur. Ceci suggère encore une différence probable de pH au niveau du stomate. Les mêmes auteurs constatent, cependant, une présence plus marquée d'anthoxanthine dans les stomates. Enfin l'absence d'anthoorphnine dans les cellules stomatiques des Composées a été signalée par Schittengruber (1933).

Tous ces faits font ressortir la profonde spécialisation des cellules stomatiques par rapport aux cellules épidermiques banales dans une espèce donnée. Ils ont permis à Weber (1933 d) de consacrer définitivement le terme d'« idioblastes » attribué aux stomates. L'étude du développement du stomate du pétiole de *Populus pyramidalis* Rozier nous permettra de mettre en évidence la précocité du caractère idioblastique qui apparaît déjà, dans l'exemple étudié, au niveau de l'initiale stomatique.

I. Technique

Nous avons procédé le plus souvent par des arrachements d'épidermes qui ont été effectués sur des pétioles d'âges variés. Généralement les observations ont été faites après montage dans le réactif lactique de Gazet du Châtelier (1948). Ce réactif a non seulement l'avantage d'éclaircir la préparation et de colorer électivement l'amidon et les gouttelettes soudanophiles, mais encore permet de conserver la préparation pendant quelques semaines.

L'étude par arrachement de lambeaux d'épiderme a été corroborée, d'autre part, dans les cas des jeunes stades, par l'observation de coupes tangentielles et transversales au microtome, après fixation à l'alcool acétique et inclusion à la paraffine. Dans ce cas la coloration a été faite par la méthode à l'hématoxyline-iode de Guilliermond.

II. La différenciation de l'initiale stomatique

Un arrachement d'épiderme d'un pétiole de quelques millimètres nous montre (Fig. 1) les cellules épidermiques en train de se rediviser en formant des files longitudinales dans la direction de croissance en longueur de l'organe. Les initiales stomatiques se reconnaissent alors aisément par leur hypertrophie et le fait qu'elles ont cessé de se rediviser : elles apparaissent alors sous forme de cellules isolées, assez régulièrement polygonales, généralement hepta- ou octogonales. Ces initiales sont assez distantes les unes des autres et relativement rares comme les stomates du pétiole adulte auxquels elles donneront directement naissance, sans former de cellules annexes.

L'étude des coupes au microtome, tangentielles et transversales, dans un pétiole de 2 mm. environ, fixé à l'alcool acétique, révèle déjà non seulement la cytologie spéciale à l'initiale stomatique, mais encore une évolution cytologique concomitante des cellules avoisinantes.

La Figure 2 montre une coupe tangentielle colorée à l'hématoxyline-iode (méthode de Guilliermond). L'initiale stomatique se distingue tant par sa grande taille que par sa cytologie, typique des « méristémoïdes » : cytoplasme très dense dans lequel on distingue un noyau et un nucléole tous deux fortement hypertrophiés. Cette hypertrophie est particulièrement accentuée au niveau du nucléole dont le diamètre est supérieur au double de celui du nucléole d'une cellule banale, peu différenciée de l'épiderme correspondant. La coloration à l'iode (non apparente sur notre photographie) met cependant en évidence de gros lastes qui entourent comme d'une couronne le noyau hypertrophié et qui sont littéralement gonflés d'amidon. Si l'on opère un arrachement d'épiderme sur un pétiole provenant d'un bourgeon cueilli en été et en fin de matinée on peut facilement mettre en évidence cet amidon de l'initiale stomatique, après traitement au réactif lactique de Gazet du Châtelier (Fig. 4). Nous avons d'ailleurs retrouvé ce pouvoir amylosynthétique exalté, peu après la division de l'initiale, dans les cellules stomatiques naissantes du même pétiole (Fig. 5).

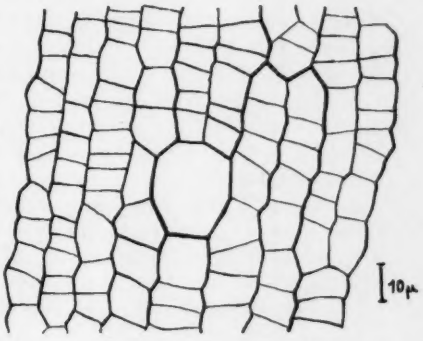


Fig. 1. — Disposition de l'initiale stomatique hypertrophiée dans les files cellulaires épidermiques encore en active redivision.

Le pouvoir amylosynthétique accru, si particulier aux cellules stomatiques, apparaît donc déjà, indépendamment de tout fonctionnement stomatique et même antérieurement à toute différenciation ostiolaire, dès le stade de l'initiale stomatique. Cette capacité précoce permet donc déjà de conférer un caractère idioblastique à l'initiale, cette dernière n'ayant plus qu'à le transmettre aux cellules filles stomatiques. L'initiale stomatique n'est donc pas, dans notre cas, du type simplement méristémoïde, mais une cellule pseudo-méristématique hypertrophiée présentant déjà l'un des caractères de différenciation idioblastique du stomate futur.

III. Rapports entre la différenciation de l'initiale stomatique et les tissus avoisinants

1° Cellules mésophylliennes sous-jacentes : précocité de la lacune sous-stomatique

La coupe transversale (Fig. 3) montre que l'hypertrophie de l'initiale stomatique se fait également en direction radiale : elle dépasse en profondeur, comme à la surface, le niveau des cellules épidermiques adjacentes :

sa membrane externe est légèrement rehaussée en cône au niveau de la formation des futurs becs ostiolaires. La même coupe montre que dès ce stade il apparaît au-dessous de l'initiale un méat triangulaire plus important. Ce méat s'élargira ultérieurement en vue de la formation de la lacune caractéristique de la chambre sous-stomatique, dont il représente donc la première ébauche.

2° Cellules épidermiques voisines de l'initiale stomatique

La différenciation cytologique de l'initiale stomatique s'accompagne d'une évolution cytologique très marquée des cellules épidermiques avoisinantes. Ces dernières paraissent vieillir en se vacuolisant d'une manière très poussée (Fig. 2 et 3) : le cytoplasme se creuse de grandes vacuoles et le noyau prend une position pariétale. Dans la Fig. 2, le phénomène n'est pas achevé (une cellule, à gauche n'est pas affectée), mais il peut finir par s'étendre tout autour de l'initiale qui se trouve ainsi comme encerclée de cellules évoluées. L'ensemble forme une plage allongée, s'étendant surtout dans la direction de l'organe, de part et d'autre des pôles stomatiques. Les cellules plus éloignées conservent leur cytologie encore quasi méristématique et continuent encore à se diviser très activement, comme le montrent de nombreuses mitoses dans les files cellulaires à distance de l'initiale.

Le phénomène de viellissement des cellules „epidermiques, périphériques à l'initiale, pourrait être considéré comme une manifestation cytologique et brutale de l'influx inhibiteur exercé par l'initiale stomatique qui empêcherait autour d'elle toute différenciation ultérieure de cellule-mère stomatique. Cette zone d'inhibition, ou « Hemmzone », selon l'expression de Bünning et Sagromsky (loc. cit.), s'étendrait cependant bien au-delà de cette manifestation cytologique différenciatrice qui ne dépasse guère un rayon de 2 ou 3 cellules autour de l'initiale. Il n'en est pas moins vrai cependant que

---

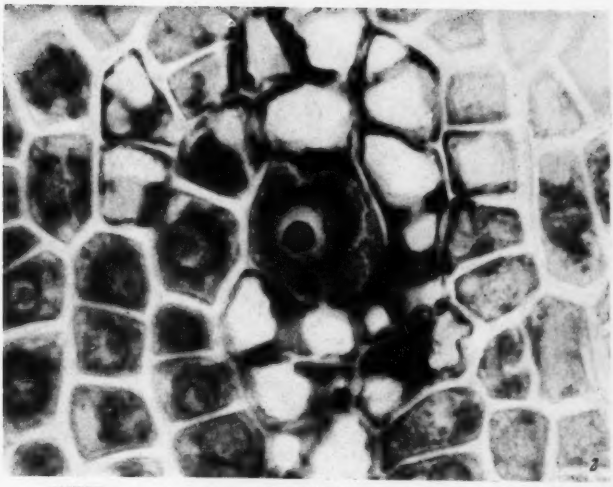
Légendes des figures ci-contre.

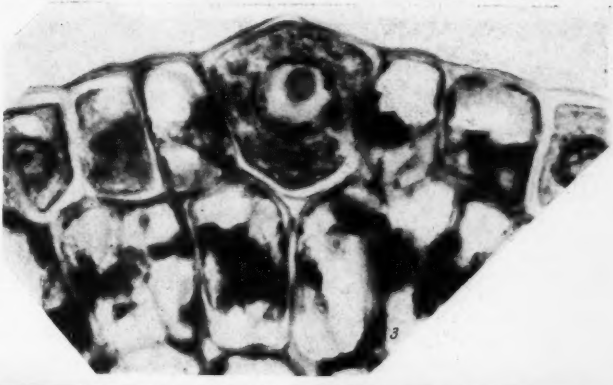
Fig. 2. — Coupe tangentielle dans l'épiderme d'un pétiole de quelques millimètres : initiale stomatique de cytologie pseudo-méristématique et partiellement entourée d'une zone allongée de cellules fortement vacuolisées qui contrastent avec les cellules juvéniles à noyau central de l'épiderme banal. (Alcool acétique, hématoxyline-iode de Guilliermond). 1440×.

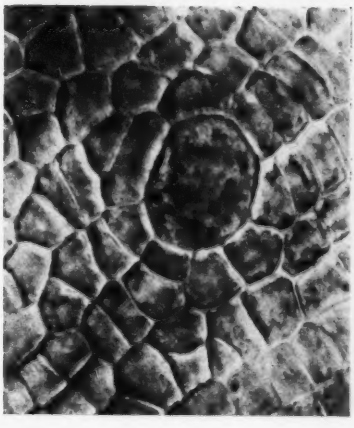
Fig. 3. — Coupe transversale dans un jeune pétiole montrant l'initiale stomatique bordée de cellules épidermiques très évoluées et vacuolisées ; vers les extrémités de la photographie cellules épidermiques juvéniles banales (noyau central). Remarquer le gros méat triangulaire sous l'initiale. (Alcool acétique, hématoxyline-iode de Guilliermond.) 1400×.

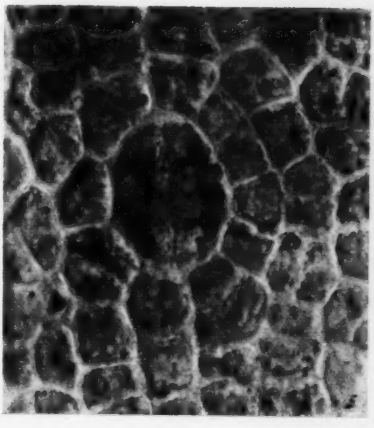
Fig. 4. — Initiale stomatique avec grains d'amidon (pétiole d'environ $^1/_2$ cm. de long). Coloration de Gazet du Châtelier. 900×.

Fig. 5. — Après redivision de l'initiale : grains d'amidon dans les cellules stomatiques naissantes (même pétiole que précédemment et même coloration). 900×.









ce vieillissement précoce des cellules entourant l'initiale réalise une différenciation dans un sens opposé à celui d'un méristémoïde, les éloignant ainsi de l'aptitude à la différenciation stomatique.

Résumé et conclusions

De l'ensemble de ces observations nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1° L'initiale stomatique du pétiole de *Populus pyramidalis* est une cellule hypertrophiée dont les caractères cytoplasmiques et nucléaires sont du type « méristémoïde » (densité cytoplasmique, hypertrophie nucléaire et nucléolaire).

2° L'aptitude amylosynthétique exaltée apparaît déjà précocement dans l'initiale stomatique, donc antérieurement à toute différenciation et fonctionnement stomatique. La cellule-mère du stomate n'est donc pas une cellule indifférenciée,mais une cellule hyperactivée présentant précocement l'une des différenciations idioblastiques du stomate futur.

3° La différenciation idioblastique précoce s'accompagne d'un vieillissement tissulaire périphérique contrastant avec la cytologie juvénile des cellules épidermiques banales et plus éloignées qui prolifèrent encore activement. La sénescence précoce des cellules épidermiques périphériques pourrait être interprêtée comme une manifestation brutale de la zone d'inhibition des différenciations stomatiques de Bünning et Sagromsky qui s'étendrait cependant au-delà de cette réaction cytologiquement décelable.

Bibliographie

Brat und Weber, 1951: Anthoxanthin in den Schließzellen von *Victoria amazonica* und *Nymphaea zanzibariensis*. Phyton 3, 21—28.

— Kenda und Weber, 1951: Rhabdoiden fehlen den Schließzellen von *Drosera*. Protoplasma *40*, 633—635.

Bünning, E., und Fr. Biegert, 1933: Die Bildung der Spaltöffnungsinitialen bei *Allium Cepa*. Z. Bot. *41*, 17—39.

— und H. Sagromsky, 1948: Die Bildung des Spaltöffnungsmusters in der Blattepidermis. Z. Naturforsch. 3 *b*, 203—216.

Gazet du Chatelier, 1948: Un nouveau réactif pour l'analyse des poudres et des coupes végétales. Ann. pharm. fr. *6*, 35—39.

Kenda, G., 1950: Anthozyanstaub in der Antherenepidermis von *Papaver*. Phyton *2*, 288—290.

Sagromsky, H., 1949: Weitere Beobachtungen zur Bildung des Spaltöffnungsmusters in der Blattepidermis. Zur Frage der Gruppenbildung. Z. Naturforsch. *4 b*, 360—367.

Schittengruber, B., 1953: Chromoplasten fehlen den Schließzellen. Protoplasma *42*, 102—104.

— 1950: Das Anthoorphnin der Kompositen-Involukralblätter fehlt ihren Schließzellen. Protoplasma *42*, 324—327.

Strasburger. E., 1866: Ein Beitrag zur Entwicklungsgeschichte der Spaltöffnungen. Jb. wiss. Bot. *5*, 297—342.

Thaler, I., 1933: Proteinoplasten fehlen den Schließzellen. Protoplasma *42*, 90—93.
— 1934: Eiweißspindel von *Valerianella*. Öst. Bot. Z. *101*, 366—369.
— 1936: Eiweißkristalle in der Epidermis von *Scindapsus aureus*. Phyton *6*, 89—91.
Weber, H., 1949: Über die Bildung von Spaltöffnungsgruppen an Sproßachsen. Ber. dtsch. bot. Ges. *62*, 114—115.
— 1955 a: «Elaioplasten» fehlen den Schließzellen von *Hosta plantaginea*. Protoplasma *44*, 460—462.
— 1955 b: «Sterinoplasten» fehlen den Schließzellen. Protoplasma *44*, 462—463.
— 1955 c: Kalziumoxalatkristalle fehlen den Schließzellen. Protoplasma *44*, 464—468.
— 1955 d: Stomata-Zellen als Idioblasten. Öst. bot. Z. *102*, 436—443.
Ziegenspeck, 1935: Das Vorkommen der Fila in radialer Anordnung in den Schließzellen. Protoplasma *44*, 385—388.
Zimmermann, W., D. Woernle und L. Warth, 1933: Die Entwicklung von Haaren und Spaltöffnungen bei *Pulsatilla*. Z. Bot. *41*, 227—246.

Kurze Mitteilung

Vitalitätsprüfung reifer und überreifer Zellen aus dem Fruchtfleisch von *Sorbus aria*

Von

Franz Enöckl

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 19. Jänner 1959)

Reife und überreife Früchte der Mehlbeere unterscheiden sich bereits äußerlich hinsichtlich ihrer Farbe und Konsistenz. Während die reifen Beeren noch fest und orangerot sind, zeigen die überreifen braunrote Farbe, sind weich und lassen sich zwischen den Fingern zerdrücken.

Die Vitalitätsunterschiede sollten nun auf zwei Wegen herausgearbeitet werden: über das plasmolytische Verhalten und über die Plasmafluorochromierung mit Uranin.

I. Plasmolyseversuche

Zur Beobachtung wurde jeweils aus derselben Beere mit der Pinzette eine Portion Zellen entnommen, in einen Tropfen Plasmolytikum verteilt und nach dem Auflegen eines Deckglases im Mikroskop beobachtet. Die Zellen der reifen Frucht besitzen spindelförmige bis runde Chromoplasten, die sich nicht selten auch systroph um den Kern lagern. In einzelnen Zellen scheinen sie auch mehr oder weniger zerfallen, ihre Teile befinden sich dann in lebhafter BMB. Einzelne Zellen speichern Stärke. Häufig treten Nekrosestadien auf, bei denen der Tonoplast noch erhalten, das ihm anhaftende Plasma aber bereits koaguliert ist.

Unter den Zellen überreifer Beeren zeigen viele Schrumpfprotoplasten, die Chromoplasten sind fast durchwegs rund, doch finden sich, wenn auch nur selten, solche spindelförmiger Gestalt.

Im folgenden seien die Protokolle der angestellten Plasmolyseversuche mit verschiedenen Plasmolytika abgestufter Konzentration wiedergegeben.

A: Zellen reifer Beeren

B: Zellen überreifer Beeren

Plasmolyse mit 2,0 mol Traubenzucker

A Die meisten Zellen zeigen normale, wohlgerundete Konvexplasmolyse, seltener findet sich auch tiefbuchtige Konkavabhebung des Protoplasten, wobei erstere beim Durchsaugen von Leitungswasser normal zurückgeht, während dies bei letzterer selten der Fall ist. Kommt es doch zu einem Rückdehnen, so endet das immer mit einem Platzen.

B Konkav- und Konvexplasmolyse, wobei der Protoplast runzelige Oberfläche zeigt und bei Plasmolytikumverdünnung nicht mehr zurückdehnt.

Plasmolyse mit 1,5 mol Traubenzucker

A Zellen mit Konvex- und Konkavplasmolyse halten sich zahlenmäßig ungefähr das Gleichgewicht. Erstere zeigen häufiger runde als spindelförmige Chromoplasten und ihr Plasma sieht völlig intakt aus, was sich auch in völliger Deplasmolysierbarkeit ausdrückt. Letztere weisen entweder keine Deplasmolyse auf oder überleben diese nicht.

B Das plasmolytische Verhalten der durchwegs schwach nekrotisch erscheinenden Zellen ist sehr unterschiedlich. Es finden sich Zellen, die keine oder ganz schwache konvexe Abhebung zeigen und andere, bei denen sich der Protoplast nur an einem Zellpol von der Membran abhebt. Deplasmolyse ist in keinem Fall mehr zu erreichen.

Plasmolyse mit 1,0 mol Traubenzucker

A Konkav- und Konvexplasmolyse; diese schwach auch bei Zellen mit Vakuolenkontraktion. Deplasmolyse mit Leitungswasser verläuft völlig normal.

B Keine Plasmolyse oder Protoplastenkontraktion zu beobachten.

Plasmolyse mit 1,5 mol KNO_3

A Das Gros der Zellen weist Tonoplastenplasmolyse auf, wobei auch vereinzelt Vakuolenteilung auftritt. Das Plasma dieser Zellen ist offensichtlich schwer geschädigt, die BMB ist nur mehr auf verschiedene Plasmabezirke beschränkt und von geringer Intensität. Die Chromoplasten sind hier durchwegs gerundet. Oft zu findende Zellen mit Konvexplasmolyse besitzen spindelförmige, seltener runde Farbstoffträger. Selten tritt Vakuolenkontraktion auf, die auch mit Konvexplasmolyse verbunden sein kann; Chromoplasten hier rund. Die meisten Zellen, auch alle mit Tonoplastenplasmolyse, platzen bei Zugabe von Leitungswasser, wenige dehnen normal zurück.

B Vakuolenkontraktion und Tonoplastenplasmolyse fehlen hier ganz; vereinzelt tritt schwache Konvexabhebung auf. Beim Durchsaugen von Leitungswasser allgemeines Absterben.

Plasmolyse mit 1,0 mol KNO_3

A Schwache Konvex- und Tonoplastenplasmolyse sind gleich häufig zu finden, wobei Deplasmolyse mit Leitungswasser bei letzterer mit einem Platzen verbunden ist, während die meisten der ersten Zellen normal ausdehnen.

B Konvex- und Tonoplastenplasmolyse wie bei A, doch zahlenmäßig geringer. Deplasmolyse verläuft immer letal.

Plasmolyse mit 0,5 mol KNO_3

A Keine Tonoplastenplasmolyse. Sehr schwache Konvexplasmolyse tritt neben vereinzelter Vakuolenkontraktion (ohne Plasmolyse) auf. Deplasmolyse wird ohne Schaden ertragen.

B Vakuolenkontraktion und Plasmolyse fehlen.

Plasmolyse mit 2,5 mol Ca-Chlorid

A In dieser extrem stark hypertonischen Lösung tritt am häufigsten Tonoplastenplasmolyse mit Vakuolenteilung auf, wobei die Teilvakuolen meist mit einem dickem Plasmastrang in Verbindung bleiben. Daneben finden sich aber auch Zellen mit Krampfplasmolyse und mächtigen Plasmawandsträngen. Einzelne, frei im Plasmolytikum liegende Zellen weisen meist Tonoplastenplasmolyse, Zellen, zu größeren Zellhaufen aggregiert, meist Krampfplasmolyse auf. Durchsaugen von 1,0 und 0,3 mol. Traubenzuckerlösung bewirkt Abrundung der krampfigen Plasmolyseform und Protoplastenausdehnung bis zur vollen Zellgröße, was den vitalen Zustand der Zellen beweist. Bei vielen Zellen wird dieses Stadium jedoch nicht erreicht, sondern es kommt schon vorher zu einem Platzen, auf welches ein Protoplastenschrumpfen folgt. Die Tonoplasten gehen nach kurzer Ausdehnung ebenfalls zugrunde.

B Vereinzelt zu beobachten sind Zellen mit Krampfplasmolyse, wobei aber die Protoplastengestalt etwas gerundeter als bei A erscheint. Daneben finden sich noch Zellen mit Tonoplastenplasmolyse. In beiden Fällen verläuft die Deplasmolyse letal.

Plasmolyse mit 1,65 und 0,8 mol Ca-Chlorid

Plasmolyseformen wie oben, nur schwächerer Plasmolysegrad. Die Zahl der Zellen mit Tonoplastenplasmolyse und die der bei Deplasmolyse zugrunde gehenden Zellen nimmt mit fallender Konzentration des Plasmolytikums ab.

Ein anderes zur Untersuchung herangezogenes Material zeigte in den Zellen überreifer Beeren allgemein, in den Zellen reifer Früchte aber nur vereinzelt Stärke (Jodprobe positiv). Diese lag im ersten Fall meist in Form verklumpter Körner beisammen, der Protoplast dieser Zellen war meist geschrumpft. Das Plasmolyseverhalten der Zellen reifer Beeren entsprach im allgemeinen den Verhältnissen von A.

Das Plasmolyseverhalten und besonders die Tatsache, daß die meisten Zellen aus überreifen Beeren bei der Deplasmolyse abstarben, während von den Zellen reifer Beeren ein großer Teil eine mehr oder weniger gute Plasmolyse und Deplasmolyse überdauerte, läßt erkennen, daß die Zellen der reifen Beeren denen der überreifen in ihrer Vitalität überlegen sind.

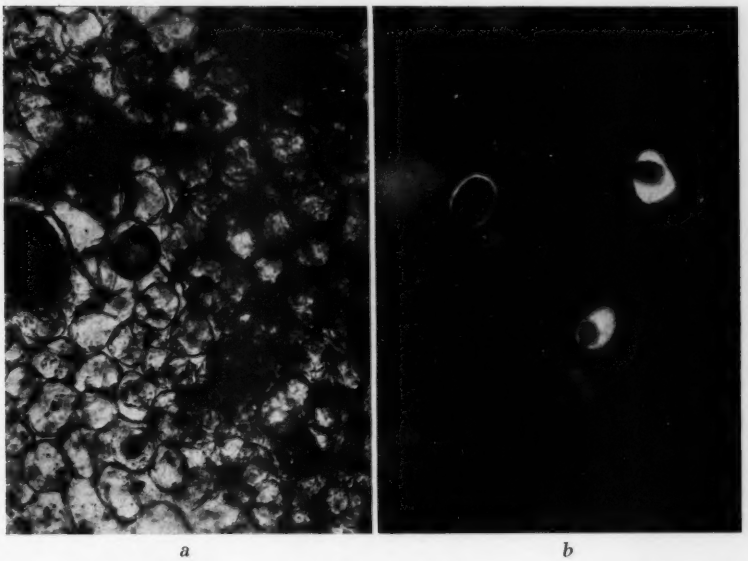
II. Plasmafluorochromierung mit Uranin

Seit Döring (1935), Strugger (1938) und Höfler, Ziegler und Luhan (1956) gilt es als gesichert, daß die Fluoreszeine nur von lebendem Plasma gespeichert werden. Es ergab sich die Frage, ob sich auch in der Tinktionsfähigkeit des Plasmas die Zellen reifer und überreifer Beeren unterscheiden würden.

Zur Vitalfärbung wurde Uranin (Na-Fluoreszein) in einer Konzentration 1 : 10,000 und vom pH 4,8 verwendet. Zusammenhängende Zellklumpen wurden der Beere entnommen und sofort in die Farblösung gebracht, in welcher sie fünf Minuten lang verblieben. Nach dem Abgießen

der Farblösung wurde so lange mit Leitungswasser ausgewaschen, bis die letzten Farbspuren verschwunden waren. Erst jetzt übertrug ich die Zellanhäufungen in einen Wassertropfen auf den Objektträger, zerteilte sie sorgfältig mit einer Pinzette und beobachtete nach dem Auflegen eines Deckglases im UV-Mikroskop. Das Ergebnis der mehrmals wiederholten Versuche sei kurz wiedergegeben.

Zellen überreifer Früchte, ob nun stärkeführend oder nicht, zeigen keine Plasmafluoreszenz. Mitunter leuchten in einzelnen Zellen die Stärkekörner ganz schwach oliv- bis graugrün. Wenn sie aber aus ver-



a *b*

Abb. 1. Fruchtfleischzellen von *Sorbus aria* mit Uranin 1 : 10,000, pH 4,8 gefärbt. *a* im Hellfeld, *b* im UV-Licht. In *b* sind zur Speicherung nur mehr wenige Zellen befähigt; am stärksten fluoreszieren Zellen mit Vakuolenkontraktion.

letzten Zellen frei geworden sind, sind sie stets fluoreszenzlos, was mit der Beobachtung Döringss (1933), wonach Stärke nur dann tingierbar war, wenn das umgebende Plasma noch lebte, in Einklang steht.

Von reifem, anscheinend lebendem Material wurden zwei Proben untersucht, wovon die eine stärkeführend, die andere stärkefrei war. Die Zellen des stärkeführenden Materials zeigen keine ausgesprochene Plasmafluoreszenz, doch ist hier schwache Stärkefluoreszenz nicht selten.

In allen Proben reifer, stärkefreier Beeren finden sich dagegen immer Zellen von grellster bis sehr schwacher Fluoreszenz des gequollenen und ungequollenen Plasmas. Ihre Anzahl bleibt jedoch weit hinter der Zahl der in den parallelgeführten Plasmolyseversuchen noch Plasmolyse ergebenden Zellen zurück. Wie wenige Zellen noch die Fähigkeit des Plasmas zur Uraninspeicherung besitzen, veranschaulicht Abbildung 1 *a* (Hellfeldaufnahme) und 1 *b* (UV-Licht) von derselben Präparatstelle. Schwache

Fluoreszenz, die bei subjektiver Beobachtung noch deutlich ist, wird im Photo nur noch undeutlich festgehalten. Am grellsten fluoreszieren die vakuolenkontrahierten Zellen, deren gequollenes Plasma, wie durch Döring (1935) bekannt und von Höfler, Ziegler und Luhan (1936) bestätigt wurde, Uranin in erhöhtem Maße zu speichern vermag. Alle noch leuchtenden Zellen zeigen die Fähigkeit zur Plasmolyse, die von konvexer oder konkaver Form sein kann.

Daß nur ein Teil der — noch plasmolysierbaren — Zellen fluoresziert, zeigt, daß die Fluorochromierbarkeit des Plasmas an einen gewissen Lebenszustand gebunden ist und bei weiter fortgeschrittener Nekrose fehlt. Zu den nicht mehr fluoreszierenden Zellen zählen wohl auch alle die, welche in hypertonischen Salzlösungen nur mehr Tonoplastenplasmolyse zeigen; doch auch von den normal plasmolysierenden Zellen haben viele bereits die Fluorochromierbarkeit eingebüßt. Die Fähigkeit, Uranin zu speichern, erscheint also, verglichen mit der Plasmolysierbarkeit, als eine feinere Lebensreaktion.

Literatur

Döring, H., 1935: Versuche über die Aufnahme fluoreszierender Stoffe in lebende Pflanzenzellen. Ber. dtsch. bot. Ges. *53*, 415.

Höfler, K., A. Ziegler und M. Luhan, 1936: Fluorochromierungsstudien mit Uranin. Protoplasma *46*, 322.

Strugger, S., 1938: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Speicherung und Wanderung des Fluoreszenzkaliums in pflanzlichen Geweben. Flora *132*, 253.

Herausgeber, Eigentümer und Verleger: Springer-Verlag, Wien I, Mölkerbastei 5. — Für den Inhalt verantwortlich: Prof. Dr. Friedl Weber, Graz, Schubertstr. 51, Prof. Dr. Josef Speck, Rostock, Zoologisches Institut, und Prof. Dr. Karl Höfler, Universität Wien. — Druck: Adolf Holzhausens Nfg., Wien VII, Kandlg. 19-21

Kurze Mitteilung

Enöckl, F.: Vitalitätsprüfung reifer und überreifer Zellen aus dem Fruchtfleisch von *Sorbus aria* 320

Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt:

Barthelmess, A., und I. Einlechner: Chemisch induzierte Mitosen. II. . 16. 11. 1958

Kümmel, G.: Feinstruktur der Wimperflamme in den Protonephridien . . 1. 12. 1958

Url, W.: Vergleichende Untersuchungen über die Resistenz pflanzlicher Plasmen gegen Natriumkarbonat 1. 12. 1958

Schneider, L., und K.-E. Wohlfarth-Bottermann: Protistenstudien IX. (Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Amöben unter besonderer Berücksichtigung der Feinstruktur des Cytoplasmas) 19. 12. 1958

Krisai-Knyrim, Dietlinde: Über das osmotische Verhalten von Basidiomyceten-Hyphen im Normalzustand und nach Frosteinwirkung 26. 12. 1958

Zöttl, P.: Vitalfärbestudien mit Methylrot 23. 1. 1959

Pfeiffer, H. H.: Über die Ermittlung der kinetischen Energie von Chromosomen in der Anaphase 30. 1. 1959

Url, W.: Phasenoptische Untersuchungen an Fruchtfleischzellen von *Symphoricarpus racemosus* Michx. 9. 2. 1959

Steinlesberger, Erna: Plasmolysestudien an Laubmoosen. (II. Osmotische Werte) 16. 2. 1959

Klima, J.: Das Bild des Endoplasmatischen Reticulum von *Planaria alpina* in Abhängigkeit vom pH-Wert des Fixierungsmittels 11. 3. 1958

Lindner, Hildegard: Die lichtabhängige Vakuolisation der Chloroplasten in Nikotinlösungen (II. Elektronenmikroskopische Untersuchungen) 28. 3. 1959

Ziegler, Annemarie: Zur Anatomie und Protoplasmatik der Ölidioblasten von *Houttuynia cordata* 7. 4. 1959

Tessenow, W.: Untersuchungen an den interstitiellen Zellen von *Pelmatohydra oligactis* Pallas und *Cordylophora caspia* Pallas unter besonderer Berücksichtigung spezifischer Färbemethoden 10. 4. 1958

Larcher, W., und H. Eggarter: Anwendung des Triphenyltetrazoliumchlorids zur Beurteilung von Frostschäden in verschiedenen Achsengeweben bei *Pirus*-Arten, und Jahresgang der Resistenz 21. 4. 1959

Nakazawa, S.: Morphogenesis of Fern Protonema. II. Modification of the Apical Differentiation in *Dryopteris* Affected by IAA 8. 5. 1959

Reiter, Liselotte, und F. Weber: Einschlußkörper in viruskranken *Hesperis*-Zellen 22. 6. 1959

Tüchy, Elisabeth: Plasmalemma und Aluminiumsalzwirkung 25. 6. 1959

Höfler, K.: Über die Permeabilität der Diatomee *Caloneis obtusa* 27. 6. 1959

Schmidt, W. A. K.: Über den Gaswechsel von Normal- und crowngall-Tumorgewebe von *Datura innoxia* Mill. in vitro 29. 6. 1959

Moldenhauer Brooks, Matilda: Negative Oxidation-Reduction Potentials Resulting from the Use of Auxin in Plants and Tobacco Smoke on Animal Cells 4. 7. 1959

Bancher, E., und J. Hölzl: Mikrophotometrische Untersuchungen zur Neutralrotspeicherung in den Vakuolen der Innenepidermis von *Allium cepa* 7. 7. 1959

Arens, K.: Ein Polaritätsmechanismus der Zelle. (Vorläufige Mitteilung) 9. 7. 1959

Enöckl, F.: Uranin-Fluorochromierung von *Allium*-Zellen nach Vorbehandlung mit Ammonkarbonat 16. 7. 1959

SPRINGER-VERLAG IN WIEN

Archiv für die gesamte Virusforschung

Begründet von R. Doerr

Herausgegeben von S. Gard, Stockholm, C. Hallauer, Bern, K. F. Meyer, San Francisco, E. G. Nauck, Hamburg, A. B. Sabin, Cincinnati

Schriftleitung: C. Hallauer, Bern

Zuletzt erschien:

Band IX, Heft 1. (Abgeschlossen im März 1959.) Mit 17 Textabbildungen. 134 Seiten. 1959. S 192.—, DM 32.—, sfr. 32.80, $ 7.60

Inhaltsverzeichnis: **Sabin, A. B.** Survey of Knowledge and Problems in Field of Arthropod-borne Virus Infections. — **Melén, B., T. Wesslén,** and **G. Olin.** Results of an Experimental Vaccination against Poliomyelitis. — **Philipson, L.,** and **L. Rosen.** Identification of a Cytopathogenic Agent Called U-virus Recovered from Patients with Non-diphtheritic Croup and from Day-nursery Children. — **Wesslén, T., S. Hermodsson,** and **L. Philipson.** Interference between Influenza and Poliomyelitis Viruses in Tissue Culture. — **Driessen, J. H.,** and **L. W. Greenham.** Haemadsorption in Vaccinia-Infected Tube Tissue Cultures. — **Lehmann-Grube, F.** Untersuchungen zur Wärmestabilität des Virus der lymphozytären Choriomeningitis. — **Lehmann-Grube, F., R. Ackermann, K.-A. Jochheim, G. Liedtke** und **W. Scheid.** Über die Technik der Neutralisation des Virus der lymphozytären Choriomeningitis in der Maus. — **Archetti, I., G. R. Dubes,** and **H. A. Wenner.** A Comparative Study of the Prototypic Hill Strain of ECHO Virus, Type 9 and Several Coxsackie-like Viruses Related to it Antigenically. — **Skinner, H. H.** Infection of Domestic Poultry with the Viruses of Foot-and-Mouth Disease and Vesicular Stomatitis. — **Lippelt, H.,** und **J. Söltz-Szöts.** Serologische Studien zum Herpes-simplex-Problem.

Österreichische Botanische Zeitschrift

Herausgegeben von **Lothar Geitler,** Wien

Zuletzt erschien:

106. Band, 1. und 2. Heft. (Ausgegeben im März 1959.) Mit 56 Textabbildungen. 176 Seiten. 1959. S 294.—, DM 49.—, sfr. 50.20, $ 11.65

Inhaltsverzeichnis: **Cholnoky, B. J.** Neue und seltene Diatomeen aus Afrika IV. Diatomeen aus der Kaap-Provinz. — **Handel-Mazetti, H., Frh. v.** Die Wiederauffindung des verschollenen Murrschen Tragantes (*Astragalus Murrii* Huter). — **Tschermak-Woess, Elisabeth.** Endopolyploidie der Narbenpapillen bei *Spironema fragrans.* — **Wieser, W.** Eine ungewöhnliche Assoziation zwischen Blaualgen und freilebenden marinen Nematoden. — **Leinfellner, W.** Über die röhrenförmige Nektarschuppe an den Nektarblättern verschiedener *Ranunculus-* und *Batrachium*-Arten. — **Biebl, R.** Strahlenempfindliche Keimungsphasen und Dauerbestrahlung. — **Thaler, Irmtraud, F. Weber** und **F. Widder.** Anthozyan-Idioblasten der Frucht von *Polygonatum verticillatum.* — **Geitler, L.** *Spirulina raphidioides* n. sp. und Bemerkungen über ähnliche Planktonalgen. — **Buxbaum, F.** Die behaartblütigen Cephalienträger Südamerikas. — **Geitler, L.** Morphologische, entwicklungsgeschichtliche und systematische Notizen über einige Süßwasseralgen. — Kurze Mitteilungen: **Bourrelly, P.** *Chlorapion* nov. nom. — **Geitler, L.** Die Gattung *Cyanidium.* — Besprechungen.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung